

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Interaktion von gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen mit
neutrophilen Granulozyten bei steriler Inflammation *in vivo*

von Annegret Mina-Sophie Boda
aus Karlsruhe

München 2019

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von

Priv.-Doz. Dr. Sven Reese

Angefertigt an der Medizinischen Klinik und Poliklinik I des Klinikums der
Universität München

Mentor: Prof. Dr. med. Steffen Massberg

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Sven Reese

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Sonja Härtle

Tag der Promotion: 27. Juli 2019

Für meine liebe Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Sterile Entzündung in kardiovaskulären Erkrankungen.....	3
2.	Molekulare Mechanismen der sterilen Inflammation	4
2.1.	Damage-associated Molecular Patterns (DAMPs).....	5
2.1.1.	DAMPs in kardiovaskulären Erkrankungen	7
2.1.2.	High Mobility Group Box 1 (HMGB1)	7
2.1.2.1.	Freigabemechanismen des HMGB1.....	9
2.1.2.2.	Rolle von HMGB1 in steriler Entzündung, Herzinfarkt und Atherosklerose.....	11
2.1.2.3.	HMGB1-Redoxformen.....	12
2.1.2.4.	Der HMGB1-Inhibitor BoxA	14
2.2.	Pattern Recognition Receptors (PRRs)	14
2.3.	Toll-like Receptors (TLRs)	14
2.4.	Die Rolle von CX ₃ CL1 bei steriler Inflammation.....	15
3.	Ablauf der Immunzellrekrutierung.....	19
3.1.	Rolle der neutrophilen Granulozyten	19
3.2.	Rolle der Monozyten und Makrophagen.....	22
3.2.1.	Monozyten in der sterilen Inflammation	23
3.2.2.	Aufgabe und Heterogenität der Makrophagen	26
3.2.3.	Gewebsständige Makrophagen in kardiovaskulären Erkrankungen	29
3.2.4.	Gewebsständige Makrophagen der Haut.....	29
3.2.5.	Interaktion von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten	31
3.3.	Rolle dendritischer Zellen in der sterilen Inflammation	33
4.	Visualisierung der Prozesse der sterilen Inflammation.....	35
4.1.	Die sterile Inflammation im Ohrmodell	35
4.2.	Weitere Modelle der sterilen Inflammation	35
III.	ZIELSETZUNG	37
1.	Untersuchung der Rolle gewebsständiger CX₃CR1⁺ - Zellen und ihr Zusammenspiel mit neutrophilen Granulozyten unter Bedingung einer sterilen Inflammation <i>in vivo</i>	37

2.	Untersuchung der Auswirkungen der Neutrophilendepletion auf die gewebständigen CX₃CR1⁺ - Zellen in der sterilen Inflammation <i>in vivo</i>	37
3.	Mechanismen der Dendritenbildung in gewebständigen CX₃CR1⁺ - Zellen <i>in vivo</i>	37
4.	Bestimmung der Herkunft gewebständiger CX₃CR1⁺ - Zellen durch Knochenmark-Transplantation <i>in vivo</i>	38
5.	Charakterisierung gewebständiger CX₃CR1⁺ - Zellen in der sterilen Inflammation <i>ex vivo</i>	38
IV.	MATERIAL UND METHODEN	39
1.	Versuchstiere	39
1.1.	Tierhaltung, Zucht und Hygienemanagement	39
1.2.	Tierstämme	40
1.2.1.	C57BL/6J	40
1.2.2.	CX ₃ CR1GFP	40
1.2.3.	Clec9a-Cre;Rosa26-tomato;CX ₃ CR1GFP	41
2.	<i>In vivo</i>-Untersuchungen	41
2.1.	Anästhesie	41
2.2.	Applikationstechniken	43
2.2.1.	Injektion durch Schwanzvenenkatheter	43
2.2.2.	Intraperitoneale Injektion	43
2.2.3.	Subkutane Injektion	44
2.3.	Erstellung von Knochenmarkchimären	44
2.3.1.	Definition Chimäre	44
2.3.2.	Zellaufbereitung für die Transplantation	45
2.3.3.	Bestrahlung der Empfängertiere	46
2.3.4.	Applikation der Knochenmarkzellen	46
2.4.	Intravitale 2-Photonen-Mikroskopie	47
2.4.1.	Grundlagen der 2-Photonen-Mikroskopie	47
2.4.2.	Aufbau des 2-Photonen-Mikroskops	50
2.4.3.	Bildauswertung	51
2.5.	Die sterile Entzündung im Ohrmodell	52
2.5.1.	Präparation des Ohrmodells	53

2.5.2.	Laserverletzung im 2-Photonen-Mikroskop.....	53
2.5.3.	Darstellung der Strukturen <i>in vivo</i>	54
2.5.4.	Depletion der neutrophilen Granulozyten	54
2.5.5.	Injektion von BoxA und HMGB1	55
3.	<i>Ex vivo</i>-Untersuchungen.....	56
3.1.	Dermal Sheet-Präparation	56
3.1.1.	Vorbereitung der Gewebeprobe	56
3.1.2.	Durchführung der Dermal Sheet-Präparation	57
3.2.	Whole Mount Staining	58
3.2.1.	Das Prinzip der immunhistochemischen Färbung.....	58
3.2.2.	Durchführung des Dermal Sheet Whole Mount Stainings.....	58
3.3.	Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie: Grundlagen und Prinzip.....	60
3.3.1.	Airyscan-Prinzip.....	61
3.3.2.	Auswertung des Whole Mount Stainings mit dem CLSM.....	61
4.	Versuchsplanung und Durchführung	61
5.	Statistische Auswertung.....	63
V.	ERGEBNISSE	65
1.	Das Verhalten gewebständiger CX₃CR1⁺ - Zellen in der sterilen Inflammation	66
2.	Interaktion von neutrophilen Granulozyten und gewebständigen CX₃CR1⁺ - Zellen im interstitiellen Raum unter Einfluss der Laserverletzung	71
3.	Auswirkungen der Depletion neutrophiler Granulozyten auf die Ausbildung von Zellausläufern der gewebständigen CX₃CR1⁺ - Zellen	75
4.	Zusammenhang von Neutrophileneinstrom und der Bildung von Zellfortsätzen unter Einwirkung von BoxA.....	77
5.	Abhängigkeit der Ausbildung von Zellausläufern von HMGB1	81
6.	Herkunft der gewebständigen CX₃CR1⁺ - Zellen	83
7.	Charakterisierung der gewebständigen CX₃CR1⁺ - Zellen in der sterilen Inflammation <i>ex vivo</i>	85

7.1.	Charakterisierung der verschiedenen gewebsständigen Zellpopulationen in der sterilen Inflammation <i>ex vivo</i>	92
7.2.	Quantifizierung der dendritenbildenden gewebsständigen CX ₃ CR1 ⁺ - Zellen <i>ex vivo</i>	93
8.	Dendritenbildung im Clec9a- Cre; Rosa26- tomato; CX₃CR1GFP- Modell <i>in vivo</i>	95
VI.	DISKUSSION	99
1.	Wahl der Tierstämme	99
2.	Das Ohrmodell im 2-Photonen-Mikroskop	100
3.	Diskussion der Ergebnisse	101
3.1.	Gewebsständige CX ₃ CR1 ⁺ - Zellen und die Interaktion mit neutrophilen Granulozyten in der sterilen Entzündung.....	101
3.2.	Inhibition und Stimulation der Ausbildung von Zellfortsätzen	103
3.3.	Herkunft gewebsständiger CX ₃ CR1 ⁺ - Zellen	105
3.4.	Quantifizierung der dendritenbildenden gewebsständigen CX ₃ CR1 ⁺ - Zellen	106
3.5.	Ausbildung von Zellfortsätzen im Clec9a- Cre; Rosa26- tomato; CX ₃ CR1GFP- Mausmodell	107
3.6.	Bedeutung der Ergebnisse im Kontext einer sterilen Inflammation	108
4.	Ausblick.....	110
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	111
VIII.	SUMMARY.....	113
IX.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	CXIV
X.	TABELLENVERZEICHNIS	115
XI.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	116
XII.	LITERATURVERZEICHNIS	119
XIII.	DANKSAGUNG	147

I. EINLEITUNG

In der modernen Gesellschaft sind kardiovaskuläre Erkrankungen eine der häufigsten Ursachen für Todesfälle und Erkrankungen weltweit [1-4]. Die Gesamtzahl der Todesfälle aufgrund von kardiovaskulären Erkrankungen ist im letzten Jahrzehnt um 12,5 % gestiegen und repräsentiert so ein Drittel aller Todesfälle. [1, 4]. Über 95 % aller durch kardiovaskuläre Erkrankungen verursachten Todesfälle können auf folgende sechs ursprüngliche Krankheitsbilder zurückgeführt werden: koronare Herzkrankheit, Herzinfarkt, Herzerkrankungen aufgrund von Bluthochdruck, Kardiomyopathie, rheumatische Herzkrankheiten und zuletzt das Vorhofflimmern.

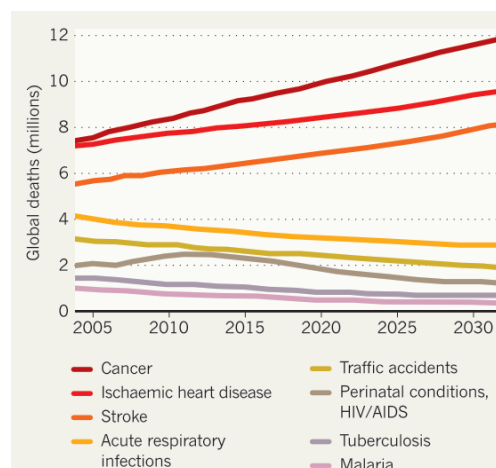


Abbildung 1: Darstellung der Todesursachen weltweit

Darstellung der Anzahl der globalen Todesfälle in zeitlicher Relation seit 2005. Die ischämischen Herzerkrankungen (zweite Linie von oben in hellrot) stellen die zweithäufigste Todesursache nach den Krebserkrankungen dar und werden voraussichtlich bis 2030 ursächlich für zwölf Millionen Todesfälle pro Jahr weltweit sein.

Mit freundlicher Genehmigung von Copyright Clearance Center, Inc., Springer Nature [5], Copyright © 2013.

Die sterile Entzündung wird durch die Abwesenheit von Pathogenen definiert und bildet die pathophysiologische Grundlage der Mehrzahl kardiovaskulärer Erkrankungen [6]. Um das Ausmaß der Entzündung zu minimieren, wird im Körper sofort eine lokale Immunantwort ausgelöst. Diese ist für die Eliminierung von Pathogenen, akkumulierten neutrophilen Granulozyten und Zelltrümmern zuständig. Die Hauptaufgabe der Immunreaktion ist die Wiederherstellung der Zellintegrität und Funktionalität des Gewebes [7].

Bedingt durch eine unkontrollierte Immunreaktionen und fehlerhafte Pathomechanismen des eigenen Körpers entstehen Gewebeschäden, die durch die Entwicklung von Immunsuppressiva und antiinflammatorischen Therapien bekämpft werden können [7]. Eine solche unzureichende Entzündungsauflösung führt zu chronischen inflammatorischen Prozessen, exzessiver Vernarbung und Organschäden, wie sie eben auch in kardiovaskulären Krankheitsprozessen, Krebserkrankungen und Autoimmunkrankheiten zu finden sind [8, 9]. Im immunkompetenten Organismus sind die meisten Entzündungsprozesse selbst limitierend und regulieren die Immunantwort durch spezifische endogene Mechanismen [8-11].

In sterilen Entzündungsprozessen nimmt das Zusammenspiel von neutrophilen Granulozyten und gewebsständigen Makrophagen eine Schlüsselrolle in der Entzündungskaskade ein. Über den genauen Ablauf dieser interstitiellen Zellinteraktionen ist bislang jedoch nur wenig bekannt.

In dieser Arbeit wurde der Fokus auf die Interaktion von gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen mit neutrophilen Granulozyten in der sterilen Inflammation gesetzt, um das Zusammenspiel dieser Immunzellen aufzuklären und den *in vivo*-Pathomechanismen auf den Grund zu gehen. Im murinen Ohrmodell wurde unter Zuhilfenahme der Zwei-Photonen-Mikroskopie eine sterile Inflammation im Gewebe simuliert, um die Kommunikation der oben genannten Immunzellen über die Zeit zu analysieren. Durch weitere Untersuchungen wurde die Herkunft der gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen ermittelt und eine Charakterisierung durch immunhistochemische Fluoreszenzfärbungen vorgenommen.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Sterile Entzündung in kardiovaskulären Erkrankungen

Die Inflammation ist ein Schlüsselmechanismus für die Immunabwehr von invasiven Pathogenen. Das Immunsystem besteht aus zwei Komponenten: dem angeborenen Immunsystem und dem erworbenen Immunsystem. Wenn eine Infektion des Organismus stattgefunden hat, wird eine Immunkaskade angestoßen, die zur Rekrutierung von inflammatorischen Zellen, besonders der Zellen des angeborenen Immunsystems, wie neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, führt. Diese Immunzellen wiederum phagozytieren Pathogene und sezernieren proinflammatorische Zytokine und Chemokine, die zur Aktivierung der Lymphozyten und der Immunantwort des erworbenen Immunsystems beitragen. Darüber hinaus ist die Entzündungsreaktion essentiell für die Wiederherstellung des intakten Gewebes und der Wundheilung [6].

Als sterile Inflammation werden Entzündungsreaktionen beschrieben, die ohne die Beteiligung von Mikroorganismen entstehen [6]. Ein Beispiel einer sterilen Entzündung im kardiovaskulären Bereich ist der Reperfusionsschaden, wie er bei Myokardinfarkt und Schlaganfall in Erscheinung tritt. Das Wiedereinsetzen des Blutflusses in das Gefäß sorgt für eine Zerstörung des Gewebes durch infiltrierende rekrutierte neutrophile Granulozyten. Die durch nekrotische Zellen, vermehrte Produktion von Reactive-Oxygen-Species (ROS) verstärkt die Entzündung zusätzlich [6, 12].

Auch bei Atherosklerose tritt die sterile Entzündung als Auslöser in Erscheinung: Hier führt die Aufnahme von Cholesterinkristallen durch Makrophagen zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Die Immunzellrekrutierung ist ein essenzieller Bestandteil der Plaquebildung [5, 6, 13, 14]. Neben chronischer Inhalation von sterilen Agenzien (wie Asbest und Silikon), die zur persistierenden Aktivierung von Alveolarmakrophagen und interstitieller Fibrose [6, 15] führen, ist die sterile Inflammation auch bei Gicht [16, 17], der Alzheimer Erkrankung [18] und Tumoren [19] beschrieben. Zuletzt kann auch ein Trauma der Auslöser einer sterilen Inflammation sein [20].

2. Molekulare Mechanismen der sterilen Inflammation

Chen und Nunez definieren die sterile Inflammation als eine Entzündung, welche in Abwesenheit von Mikroorganismen, aufgrund einer Verletzung des Gewebes auftritt [6].

Das menschliche Immunsystem besitzt die Möglichkeit, nicht nur körpereigenes von körperfremdem Gewebe zu unterscheiden, sondern auch gesundes von verletztem Gewebe abzugrenzen [20, 21]. Sobald eindringende Pathogene oder Moleküle vom angeborenen Immunsystem durch Pattern Recognition Rezeptoren (PRRs) erkannt werden, reagiert der Körper mit einer Entzündung [22-24]. Neben protektiven Eigenschaften der Entzündung, die eingedrungenen Keime zu eliminieren, Gewebsschäden zu reparieren und die Gesundheit wiederherzustellen, führt eine überschießende Reaktion des Immunsystems auch zur Entwicklung von kardiovaskulären Krankheiten, Autoimmun- und neurodegenerativen Erkrankungen [22, 25, 26].

Das Immunsystem unterscheidet zwischen verschiedenen Arten des Zelltods: Im physiologischen Zustand gehen Zellen durch den Vorgang der Apoptose ohne Aktivierung des Immunsystems zu Grunde (programmierter Zelltod). Kommt es dagegen aufgrund von Gewebsverletzung, Infektion oder toxischen Einflüssen zur Nekrose der Zellen, so wird das angeborene Immunsystem aktiviert. Die daraufhin mobilisierten Zellen und Mediatoren sind im Stande, den Gewebeschaden abzuräumen und den physiologischen Zustand des Gewebes wiederherzustellen. Der Zelltod aufgrund von Nekrose spielt eine tragende Rolle in vielen vaskulären Erkrankungen und nimmt eine Schlüsselrolle in der Aktivierung des angeborenen und erworbenen Immunsystems ein. Dabei ist der Beginn und die Auflösung der Entzündung von der Interaktion zwischen Immunzellen und weiteren Zellpopulationen abhängig [27].

Durch die bei sterilen Entzündungsprozessen entstehende Zellnekrose werden Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) freigegeben. Diese binden an die Zelloberfläche von Immunzellen und sind für die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen zuständig [7, 28-30]. Proinflammatorische Makrophagen sind die erste Zellpopulation im Gewebe, die DAMPs detektieren [7].

Durch die proteolytische Verdauung der Proteine durch die Makrophagen wird die Viskosität des Gewebes reduziert und die Permeabilität der Gefäße nimmt zu. Es kommt zur Schwellung des Gewebes, zur Stimulation der Migration von Leukozyten in den interstitiellen Raum und zur Förderung der Zugänglichkeit von Oberflächenrezeptoren der DAMP-Agonisten. Somit beginnt die Entzündungskaskade [7].

2.1. Damage-associated Molecular Patterns (DAMPs)

Im Jahr 1989 postuliert Janeway ein Prinzip, das dem Immunsystem die Möglichkeit zuschreibt, körpereigene Zellen und Gewebe von eindringenden Fremdkörpern basierend auf der Struktur von pathogenen Molekülen differenzieren zu können [31]. Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) werden von antigenpräsentierenden Zellen (APCs) durch Toll-like Rezeptoren (TLRs) erkannt, die wiederum passende Peptide präsentieren. Somit werden naive T-Helferzellen aktiviert und zur Proliferation und Differenzierung angeregt. In dieser „Stranger Theory“ verstärken T-Helferzellen weiterhin die Produktion von stimulierenden Molekülen und die Sekretion von proinflammatorischen Molekülen [31, 32]. Leider konnte diese Theorie auf bestimmte inflammatorische Reaktionen, wie zum Beispiel der Immunreaktionen bei steriler Inflammation, keine Antworten geben. Die Hypothese der „Danger Theory“ stellte Polly Matzinger im Jahr 1994 auf: In ihrer Gefahrenhypothese beschreibt sie, wie das Immunsystem Eigenschäden durch Gefahrensignale (Danger Signals) erkennt und die Aktivierung von T-Helferzellen durch dendritische Zellen (DCs) bewirkt. [33]. Diese Theorie wurde durch weitere Forschungsarbeiten mit nekrotischen Zellen untermauert, welche eine Immunantwort von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen auslösten [32, 34, 35]. In weiteren Forschungsarbeiten wurde die „Danger Theorie“ auf die akute Entzündung übertragen: TLR und Nod-like Rezeptoren (NLRs) werden den PRRs zugeteilt, die PAMPs detektieren und eine Entzündungsreaktion einleiten [32, 36]. *In vivo* konnte beobachtet werden, dass neutrophile Granulozyten und Monozyten als Reaktion auf nekrotisches Gewebe zum Entzündungsherd wandern [32, 37]. Das gleiche Phänomen wurde in der Abwesenheit von Pathogenen unter sterilen Bedingungen beobachtet [32, 38].

Seither wurde kontinuierlich an der Aufdeckung der molekularen Identitäten der Gefahrensignale sowie ihrer Rezeptoren und Verstärker gearbeitet [32]. Eine stetig steigende Anzahl von DAMPs wurde bereits identifiziert [22, 33, 39].

Durch eine Verletzung des Gewebes oder durch Nekrose werden DAMPs vom intrazellulären Raum – wo sie vom Immunsystem nicht erkannt werden – in den extrazellulären abgegeben und initiieren eine Entzündungsreaktion [22, 33]. Durch die Interaktion mit PRRs wird die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen stimuliert [22]. DAMPs werden durch Makrophagen identifiziert und eine durch TLRs und Inflammasome begünstigte Immunantwort wird ausgelöst [22, 33]. Dieser Vorgang liegt auch chronischen Entzündungskrankheiten zugrunde: Chronische Entzündungen können zur Entwicklung von inflammatorischen Erkrankungen führen, die wiederum eine Steigerung der sezernierten DAMPs zur Folge haben. In Abb. 2 ist zu sehen, wie ein *Circulus vitiosus* durch die Produktion von DAMPs und der endlosen Entzündungsreaktion entsteht [22].

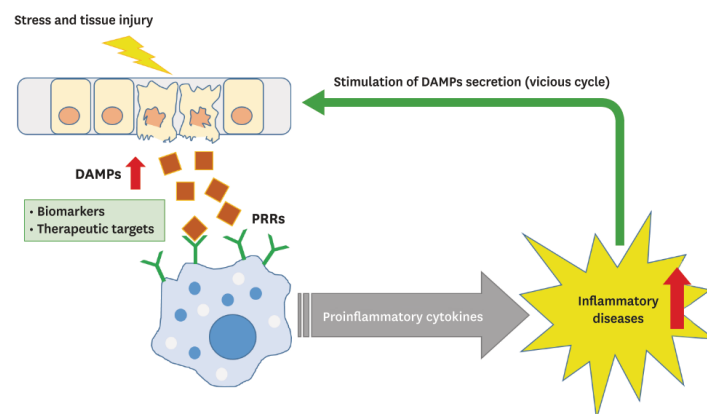


Abbildung 2: Die Entstehung eines *Circulus vitiosus* in chronischen Erkrankungen

Durch einen Reiz oder eine Gewebsverletzung werden DAMPs ausgeschüttet, die Zellen zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine anregen. Chronische Entzündungen beeinflussen die Produktion von DAMPs und begünstigen weitere Entzündungsreaktionen.

Mit freundlicher Genehmigung von Immune Network, Damage-associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases, Roh und Sohn, Copyright © 2018.

DAMPs lassen sich auf verschiedene Proteine zurückführen: extrazelluläre Proteinquellen sind zum Beispiel Biglykan und Tenascin C. Das High Mobility Group Box 1 (HMGB1), Histone, S100 Proteine, Heat-shock Proteine (HSPs) werden der Gruppe der intrazellulären Proteine zugeordnet. Als Plasmaproteinquellen für DAMPs werden Fibrinogen, Gc-Globulin und Serumamyloid A (SAA) beschrieben [22, 33, 40-43].

2.1.1. DAMPs in kardiovaskulären Erkrankungen

DAMPs spielen in kardiovaskulären Erkrankungen eine wichtige Rolle: Die Atherosklerose beschreibt eine Entzündung der arteriellen Gefäßwand, bei der sich das Lumen des Gefäßes durch eine Ansammlung von inflammatorischen Zellen und Lipiden und der daraus resultierenden Plaquebildung verengt [22, 44]. Obwohl das angeborene Immunsystem für die Aufrechterhaltung der gesunden Arterienwand zuständig ist, spielt es darüber hinaus eine tragende Rolle in der Entwicklung der Atherosklerose [22, 45]. Arterielle Verletzungen der Gefäßwand enthalten eine hohe Konzentration an DAMPs, die zur Rekrutierung von Makrophagen führen. Die sich ansammelnden Makrophagen formieren sich zu lipidhaltigen Schaumzellen und triggern die Entzündung durch die Aktivierung von PRRs [22, 44, 45].

2.1.2. High Mobility Group Box 1 (HMGB1)

Sowohl PAMPs als auch DAMPs rekrutieren und aktivieren APCs des Immunsystems. Dabei unterscheiden die Immunzellen des Körpers nicht, ob eine Autoimmunreaktion vorliegt oder ein fremdes Antigen in den Organismus eingedrungen ist, sondern ob die Anwesenheit von PAMPs oder DAMPs gegeben ist [46]. Das nukleare Protein High Mobility Group Box 1 (HMGB1), war das erste DAMP-Protein, das in der Literatur beschrieben wurde [47]. In den Jahren 1973 und 1977 wurde es von Goodwin et al. und Goodwin und Johns zum ersten Mal isoliert und als „non-histone chromatin-associated protein with high electrophoretic mobility“ beschrieben [48, 49]. Im Laufe der Jahre wurde es um weitere Eigenschaften und Funktionen ergänzt [50]. HMGB1 ist im Zellkern nahezu aller eukaryotischer Zellen zu finden und übernimmt wichtige Aufgaben im Aufbau von Nukleosomen und der Regulation der Gentranskription [50-52]. In Abb. 3 ist die Lokalisation von HMGB1 im Nukleosom (dem Komplex aus DNA und Histonen) im Zellkern schematisiert zu sehen.

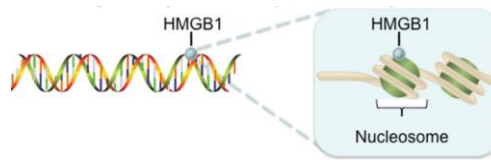


Abbildung 3: Veranschaulichung der Lokalisation von HMGB1 in der DNA und im Zellkern eukaryotischer Zellen

HMGB1 bildet einen Komplex mit Nucleosomen in eukaryotischen Zellen und ist somit in der DNA verankert.

Mit freundlicher Genehmigung von Oncotarget, The dual role and therapeutic potential of high-mobility group box 1 in cancer [53], Copyright © 2017.

Das menschliche HMGB1 besteht aus 215 Aminosäuren und ist in drei Domänen gegliedert, die in Abb. 4 dargestellt sind: BoxA und BoxB sind zwei Tandemdomänen mit einer Größe von ca. 80 Aminosäuren, die sich zu 80 Prozent ähneln und durch kurze Aminosäureketten miteinander verbunden sind. Ein 30 Aminosäuren langer, saurer C-Teil ist am Ende angehängt, der die Spezifität der Bindung von HMGB1 an die DNA reguliert [50, 54].

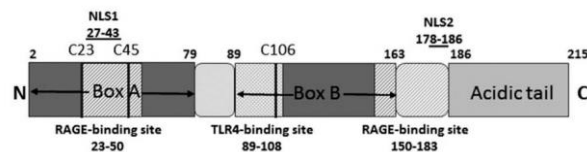


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Struktur von HMGB1

Die Struktur von HMGB1 lässt sich in BoxA, BoxB und C-Teil aufteilen. BoxA bildet hierbei eine Plattform für die Bindung von HMGB1 an RAGE während BoxB eine Bindungsstelle für TLR4 und RAGE aufweist. Am Ende ist ein säurehaltiger C-Schwanz angehängt.

Mit freundlicher Genehmigung von Copyright Clearance Center, Expert Opinion on Therapeutic Targets [55], Copyright © 2018.

Die Aufgaben und Funktionen des HMGB1, hier in Abb. 5 zu sehen, sind vielfältig: Es nimmt beispielsweise in der Rekrutierung von Immunzellen zum Ort der Entzündung eine Schlüsselrolle ein. Des Weiteren ist es an der Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen beteiligt und koordiniert so die Immunantwort auf zellulärer Ebene. Darüber hinaus werden HMGB1 wichtige Aufgaben in der Reparatur und Regeneration von Gewebe und Heilungsprozessen zugeschrieben [56, 57].

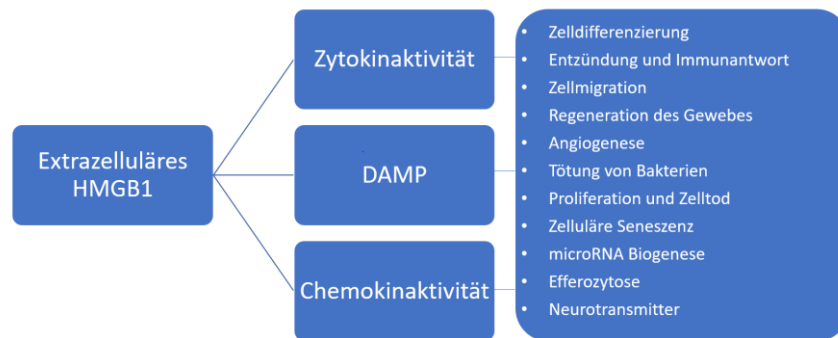


Abbildung 5: Wirkungsspektrum des HMGB1 nach Kang et al 2014

HMGB1 beeinflusst die DAMP-, Zytokin- und Chemokinaktivität. Dadurch wirkt es auf die Zelldifferenzierung ein und hat einen Effekt auf Rekrutierung und Immunantwort [58].

HMGB1 trägt maßgeblich zur Pathogenese von verschiedenen chronischen Entzündungskrankheiten und Autoimmunkrankheiten bei [47, 50, 59-62]; hohe Serumkonzentrationen wurden beispielsweise auch bei der Atherosklerose gemessen [50, 63].

2.1.2.1. Freigabemechanismen des HMGB1

Im Jahre 1999 wurde HMGB1 von Wang et al. als ein wichtiger Mediator in Entzündungsprozessen des extrazellulären Raumes beschrieben [50, 64]. In Abb. 6 ist zu sehen, dass HMGB1 zwei verschiedene Möglichkeiten besitzt, um aus der Zelle zu gelangen: Es ist bekannt, dass nekrotische Zellen die Beständigkeit ihrer Zellmembran verlieren und somit lösliche Proteine passiv aus der Zelle in den extrazellulären Raum diffundieren können. Somit kann HMGB1 von allen toten Zellen freigegeben werden – mit Ausnahme apoptotischer Zellen, welche die HMGB1-Freigabe und ihr nukleares Chromatin durch Modifizierung nicht exponieren [47].

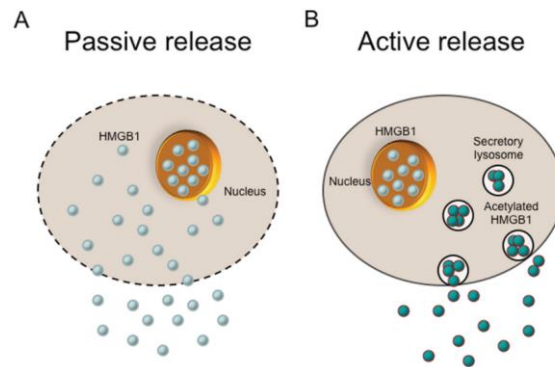


Abbildung 6: Darstellung der verschiedenen HMGB1-Freigabemechanismen

A: Schematische Veranschaulichung der passiven HMGB1-Freigabe in den extrazellulären Raum. Bei diesem Vorgang verlieren nekrotische Zellen die Beständigkeit ihrer Zellmembran. Somit diffundieren lösliche Proteine passiv aus der Zelle in den extrazellulären Raum. **B:** Darstellung des aktiven Sekretionsmechanismus von HMGB1 durch Lysozyme und Acetylierung des HMGB1s.

Mit freundlicher Genehmigung von Oncotarget, The dual role and therapeutic potential of high-mobility group box 1 in cancer [53], Copyright © 2017.

Neben der schnellen passiven Freigabe, kann HMGB1 auch aktiv von inflammatorischen Zellen (wie zum Beispiel Monozyten und Makrophagen) unter Stressbedingungen oder aufgrund der angeborenen Immunantwort auf PAMPs oder proinflammatorische Zytokine sezerniert werden [64-66]. Extrazelluläres HMGB1 reguliert die Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen, sowie metabolische oder neuronale Aktivitäten. Die jeweilige Funktion ist hierbei abhängig vom Bindungspartner, der Lokalisation und dem Redoxstatus [46, 67-70].

Nach der Freisetzung kommt es zur Akkumulation von HMGB1 im extrazellulären Raum. Dies bewirkt eine Stimulierung von PRRs im umliegenden Gewebe und resultiert in der Aktivierung des nuklearen Faktors (NF)- κ B [53]. Als Rezeptoren für HMGB1 sind Toll-like Rezeptoren (TLR2, TLR4, und TLR9) und der Rezeptor für „advanced glycation end-products“ (RAGE) bekannt [71, 72]. Nur zwei Rezeptoren, TLR4 und RAGE, werden zweifelsfrei als Liganden für HMGB1 anerkannt [67, 70, 73]. Zuständig für die Zytokinproduktion ist der TLR4 Rezeptor [67, 70, 74]. Erst kürzlich wurde entdeckt, dass der von vielen verschiedenen Zellen exprimierte proinflammatorische Rezeptor RAGE auch eine Bindungsstelle in der BoxA-Domäne aufweist [67, 75].

Makrophagen nehmen eine wichtige Position in der Immunantwort, Wundheilung und Regulation des Immunsystems ein: Durch proinflammatorische Einflüsse werden sie zur Produktion und Abgabe von HMGB1 in den extrazellulären Raum angeregt [58]. Durch die Aktivierung von Makrophagen verzögert das HMGB1 so die Immunantwort und initiiert die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen durch die Rezeptoren TLR2, TLR4 oder RAGE [58, 76]. Doch auch negative Eigenschaften von HMGB1 sind bekannt: Durch Bindung von Phosphatidylserin oder $\alpha_v\beta_3$ Integrin an apoptotische neutrophile Granulozyten oder Makrophagen, verhindert HMGB1 den Prozess der Efferozytose [58, 77, 78]. Diese Inhibition kann die Immunantwort während des Apoptosevorgangs verstärken [58].

2.1.2.2. Rolle von HMGB1 in steriler Entzündung, Herzinfarkt und Atherosklerose

Bereits in der frühen Phase der Invasion bindet das extrazelluläre HMGB1 an Endotoxine, bakterielle und virale RNA und andere pathogene Moleküle. Durch diese Komplexbildung wird die Kapazität der Aktivierung des angeborenen Immunsystems ausgeweitet [64, 79]. Die bei sterilen Entzündungen durch Immunzellen freigesetzten proinflammatorischen Chemokine wie bspw. Interleukin-1 β (IL-1 β) bilden mit HMGB1 einen Komplex. Diese Komplexbildung verstärkt wiederum die Aktivierung des angeborenen Immunsystems [79, 80].

Der Zusammenhang zwischen HMGB1 und sterilen Entzündungen wurde bereits von Goldstein et al. aufgezeigt: In Patienten mit akutem Herzinfarkt stellte man einen signifikanten Anstieg des HMGB1-Serumspiegels fest. Die Serumkonzentrationen konnten in Zusammenhang mit Versagen der Pumpleistung, Herzmuskelruptur und dem Versterben der Patienten in Krankenhauseinrichtungen gebracht werden [81, 82].

Ebenfalls konnte nach Gabe des HMGB1-Inhibitors BoxA im Mausmodell eines vorübergehenden Koronararterienverschlusses festgestellt werden, dass die Auswirkungen des Gewebeschadens erheblich vermindert waren. Im Gegensatz dazu wurde durch den Einsatz von systemischen rekombinanten HMGB1 (rHMGB1) die Schädigung des Gewebes signifikant erhöht. [82, 83].

Im Krankheitsmodell der Atherosklerose wurden glatte Muskelzellen aus atherosklerotischen Plaques isoliert und mit Cholesterin versetzt. Die Zellen der glatten Muskulatur gaben HMGB1 in den extrazellulären Raum ab.

Wurden die gleichen Zellen dagegen mit HMGB1 stimuliert, so sezernierten diese nach ihrer Aktivierung umso mehr HMGB1 an ihre Umgebung [82, 84]. In weiteren Experimenten wurde bewiesen, dass viele Zellbestandteile des atherosklerotischen Plaques, einschließlich Makrophagen, Endothelzellen, glatter Muskelzellen sowie aktivierter Thrombozyten, ebenfalls an der Freigabe von HMGB1 beteiligt sind [82, 84-87].

2.1.2.3. HMGB1-Redoxformen

Dass der Effekt von HMGB1 einen Einfluss auf die Rekrutierung von Immunzellen und deren Freigabe von proinflammatorischen Zytokinen hat, wurde in den zuvor angeführten Publikationen eingehend beschrieben. Darüber hinaus haben Venereau et al. 2012 gezeigt, dass die biologische Aktivierung von HMGB1 auf den Redoxstatus der drei Cysteine C23, C45 und C106 zurückzuführen ist. Diese wiederum können sich im verletzten Gewebe in andere Formen transformieren [88, 89].

In Abb. 7 wurde in einem Modell, bei dem ein Muskel mit Cardiotoxin verletzt wurde, gezeigt, dass reduziertes all-thiol-HMGB1 (atHMGB1) von nekrotischen Muskelzellen sezerniert wird und bereits direkt nach der Verletzung zu finden ist. Es leitet die Rekrutierung der Leukozyten durch die Komplexbildung mit dem Rezeptor CXCL12 ein. Das disulfid HMGB1 (dsHMGB1) tritt erst ein paar Stunden später auf und stimuliert rekrutierte Leukozyten wiederum zur Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen. Im Gegensatz zu atHMGB1 bindet es nicht an CXCL12 und trägt nicht zur Chemotaxis bei. Zudem wurde gezeigt, dass die ROS-Produktion die finale Oxidation von HMGB1 zur Sulfonyl-Form (oxHMGB1) bewirkt, welches dann im Laufe der Entzündung inaktiviert wird. Um die verschiedenen Aktivitäten von HMGB1 separiert zu analysieren, wurde ein mutiertes 3S-HMGB1 generiert, bei welchem alle Cysteine durch Serin ersetzt wurden (mutHMGB1). MutHMGB1 induziert die Migration der Leukozyten in das umliegende Gewebe; die Stimulation der Makrophagen zur Expression von Zytokinen und Chemokinen bleibt aber aus. Es lässt sich daraus schließen, dass mutHMGB1 sich wie atHMGB1 verhält, es sich aber nicht in andere Formen transferieren lässt. [88, 89].

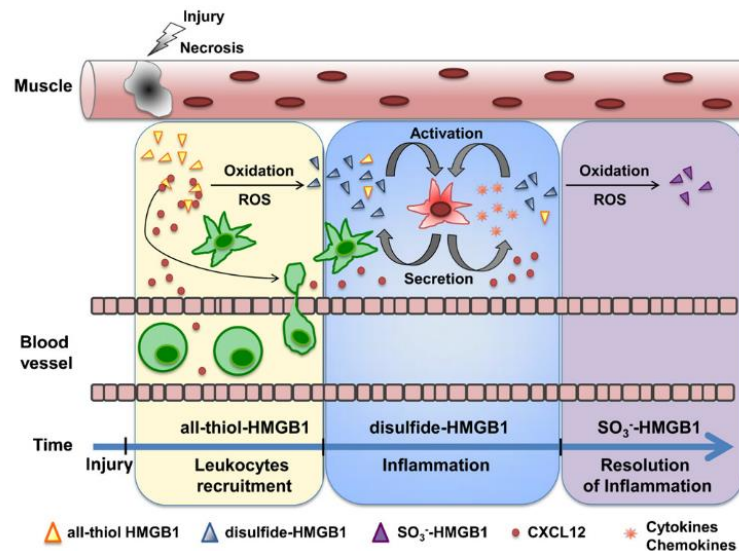


Abbildung 7: Die Aktivität von HMGB1 während einer Muskelverletzung mit Cardiotoxin

AtHMGB1 wird von nekrotischen Muskelzellen freigelassen und stimuliert die Migration der Leukozyten, indem es einen Komplex mit CXCL12 eingeht. DsHMGB1 aktiviert sie zur Sekretion von Zytokinen/Chemokinen. Die von Leukozyten produzierten ROS induzieren die terminale Oxidation von HMGB1-Cysteinen zu Sulfonaten und somit wird HMGB1 inaktiviert.

Mit freundlicher Genehmigung von Copyright Clearance Center and Elsevier Ltd, Molecular Immunology [89], Copyright © 2012.

Aus Abb. 8 geht hervor, dass alle HMGB1-Redoxformen an RAGE binden; nur atHMGB1 geht zusätzlich eine Komplexbildung mit CXCL12 ein, das wiederum das Signal an den Chemokinrezeptor CXCR4 weiterleitet. DsHMGB1 bindet darüber hinaus an TLR4 [90, 91].

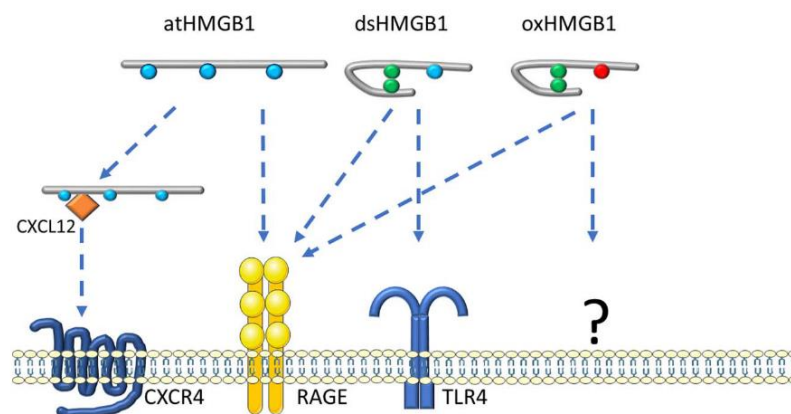


Abbildung 8: HMGB1-Redoxformen und ihre Rezeptoren

Schematisierte Darstellung der verschiedenen HMGB1-Redoxformen atHMGB1, dsHMGB1 und oxHMGB1 und deren Beziehungen zu den Rezeptoren CXCR4, RAGE und TLR4.

Mit freundlicher Genehmigung von Copyright Clearance Center und Elsevier, Seminars in Immunology [90], Copyright © 2018.

2.1.2.4. Der HMGB1-Inhibitor BoxA

In der Vergangenheit wurden viele Inhibitoren erforscht, die HMGB1 inaktivieren. Sobald es zu einer Hemmung der HMGB1-CXCL12-Achse kommt, können Entzündungsprozesse zum Erliegen kommen, die aufgrund von rekrutierten Leukozyten induziert wurden. Sowohl das Voranschreiten der Entzündung von Ischämie und Trauma als auch chronische Entzündungsprozesse wie die rheumatoide Arthritis könnten somit behandelt werden [62, 89].

Die gängigsten dabei genutzten Inhibitoren stellen monoklonale Antikörper oder BoxA dar. BoxA neutralisiert die chemotaktische Wirkung von HMGB1 ohne die Aktivierung der Zytokinausschüttung [89]. In Entzündungsmodellen wie Hepatitis [92], Peritonitis [93] und Ischämie/Reperfusionsschäden von Herz und Gehirn [83, 94] konnte bewiesen werden, dass die Reduzierung der rekrutierten Leukozyten auf die Anwesenheit von BoxA zurückzuführen war [89].

2.2. Pattern Recognition Receptors (PRRs)

Die PRRs sind ein weiterer sehr wichtiger Teil des Immunsystems. Viele verschiedene PRR-Familien wurden in verschiedenen Zellkompartimenten entdeckt. Durch bestimmte spezifische molekulare Strukturen, wie zum Beispiel den PAMPs oder DAMPs können sie Pathogene oder Gewebeschäden detektieren [22, 33, 95]. Eine Hauptfunktion der PRRs ist die Stimulierung der Phagozytose und die Unterstützung der Entzündung durch das Erkennen zahlreicher Pathogene und Moleküle aus nekrotischen Zellen [22, 23, 96]. Dies hat zur Folge, dass das angeborene Immunsystem durch inflammatorische Signalwege aktiviert wird [22, 96].

2.3. Toll-like Receptors (TLRs)

Toll-like Rezeptoren (TLR) sind sowohl an der Zelloberfläche lokalisierte transmembrane Glykoproteine (TLR1, 2, 4, 5, 6 und 10) als auch an intrazellulären Membranen zu finden (TLR3, 7, 8 und 9). Sie haben die Aufgabe, die verschiedenen PAMPs und DAMPs aufzuspüren [22, 97]. TLRs bewirken die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Typ-1-Interferonen (IFN) einerseits über den myeloide differentiation factor 88 (MyD88) Signalweg und andererseits über den toll/interferon response factor (TRIF)-abhängigen Signalweg [22, 97]. Ein weiteres Beispiel für die PRR-Familie ist RAGE, ein Rezeptor der Scavenger-Rezeptorenfamilie.

RAGE-Rezeptoren können verschiedenartige Muster erkennen, interagieren mit PAMPs und DAMPs, und führen so zu Inflammation, oxidativem Stress und Apoptose [22, 98].

2.4. Die Rolle von CX₃CL1 bei steriler Inflammation

Chemokine (auch genannt chemotaktische Zytokine) stellen eine Gruppe von kleinen, sekretierten Proteinen dar, die durch ihre G-Protein gekoppelten, heptahelikalen Chemokinoberflächenrezeptoren Signale senden. Ihr Aufgabenspektrum reicht von der Anregung der Leukozyten zur Migration, Proliferation, Differenzierung, Produktion von Zytokinen, Degranulation und der Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies über viele weitere Funktionen hinaus; wie in Abb. 9 veranschaulicht [99, 100]. Des Weiteren leisten sie einen Beitrag zur Entwicklung und Homöostase des Immunsystems und tragen zu sämtlichen protektiven und destruktiven Immunprozessen in der Entzündungsreaktion bei. Darüber hinaus können die auf Leukozyten befindlichen Chemokinrezeptoren auch von anderen Zellen ausgebildet werden und diese beeinflussen [99].

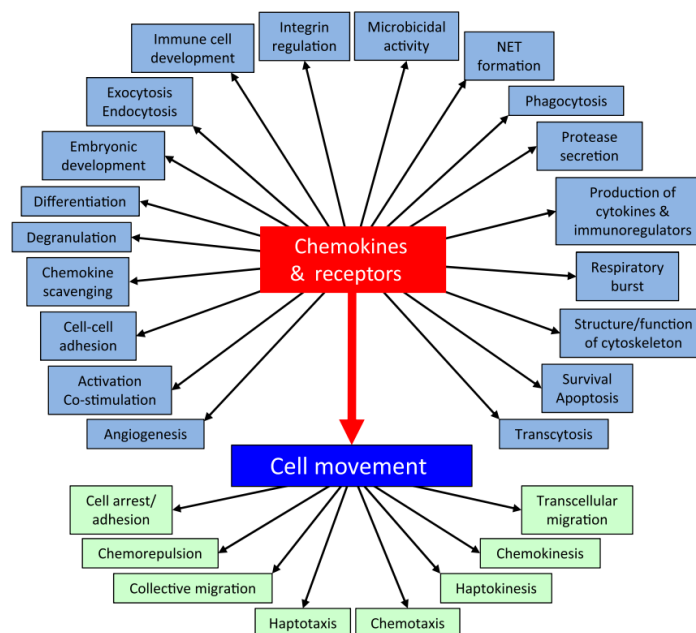


Abbildung 9: Veranschaulichung der Rolle von Chemokinen und deren Rezeptoren

Darstellung der Aufgabe von Chemokinen und ihren Rezeptoren in den verschiedenen Prozessen auf zellulärer Ebene - wie die Entwicklung von Immunzellen, Degranulation und Phagozytose.

Mit freundlicher Genehmigung von Copyright Clearance Center und John Wiley and Sons, FEBS Journal, A guide to chemokines and their receptors [99], Copyright © 2018.

Abbildung 10 ist zu entnehmen, dass Chemokine aufgrund ihrer Variation der Cysteinreste in der Nähe des N-Terminus systematisch in vier Untergruppen eingeteilt werden: CC, CXC, CX₃ und XC. Das isoliert stehende CX₃C-Chemokin hat bspw. drei Aminosäuren, die zwischen zwei Cysteinresten lokalisiert sind. Nach der Untergruppe folgt der Buchstabe „L“ (als Bezeichnung für den Liganden) und eine Nummer, die beschreibt, wann das Gen zuerst entdeckt wurde [99, 101, 102]. Chemokine mit der gleichen Bezeichnung haben meist eine ähnliche Funktion in den verschiedenen Spezies; dabei sind sie mit einem N-terminierten Signalpeptid ausgestattet, welches nach dem Einbringen des Chemokins in das Endoplasmatische Retikulum (ER) entfernt wird. CX₃CL1 und CXCL16 besitzen einen verlängerten C-Terminus und eine Transmembrandomäne. Durch diese werden die Chemokine an der Zelloberfläche gehalten und können durch proteolytische Spaltung die Chemokinfragmente in den extrazellulären Raum abgeben [99, 103-107].

Es sind zwei Familien von Rezeptoren bekannt, die an Chemokine binden können: konventionelle Chemokinrezeptoren (cCKRs) und atypische Chemokinrezeptoren (aCKRs). Zurzeit sind 18 cCKRs bekannt, die nach ihrem bindenden dominanten Chemokin benannt werden, gefolgt von dem Buchstaben „R“ (als Bezeichnung für Rezeptor) und dann einer Nummer, die die Reihenfolge der Entdeckung widerspiegelt. Neben dem einzeln vorkommenden CX₃CR und XCR sind zehn CCRs und sechs CXCRs bekannt [99].

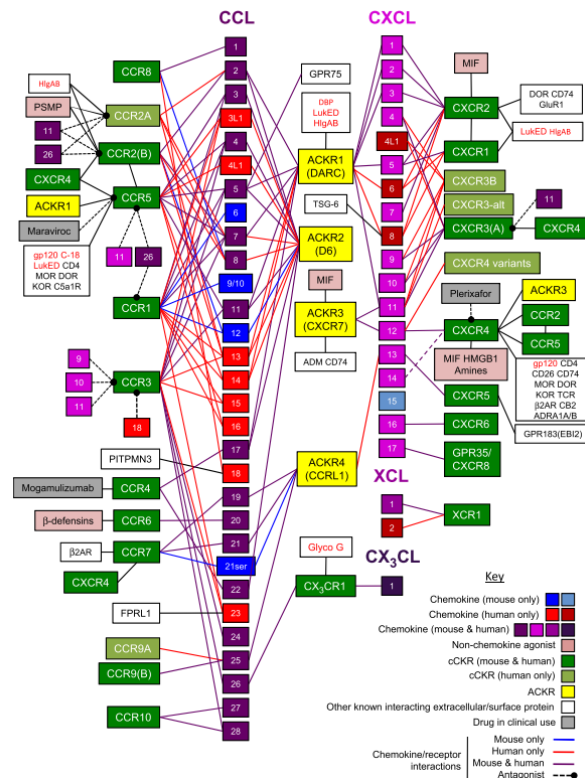


Abbildung 10: Darstellung der bisher beschriebenen Chemokine

Systemisch werden Chemokine in vier Untergruppen eingeteilt: CC, CXC, CX₃ und XC. Danach folgt der Buchstabe „L“ für Ligand und eine Nummer, die beschreibt, in welcher Reihenfolge das Gen entdeckt wurde. Ein Beispiel ist das Chemokin CX₃CL1 mit dem Rezeptor CX₃CR1.

Mit freundlicher Genehmigung von Copyright Clearance Center und John Wiley and Sons, FEBS Journal, A guide to chemokines and their receptors [99], Copyright © 2018.

CX₃CR1 gehört, wie bereits erwähnt, zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die aus sieben Transmembranhelices bestehen (GPCR). Der einzige Ligand stellt das CX₃CL1 dar, das auch als Fraktalkine oder Neurotakin bezeichnet wird [108, 109]. Sowohl das Fraktalkine als auch der Rezeptor CX₃CR1 sind im gesamten Organismus zu finden. Die vielfältigen Aufgaben und Funktionen von CX₃CR1 in verschiedenen Immunzellen wurden in den letzten zwanzig Jahren bereits intensiv studiert [105, 108].

CX₃CR1 wird von vielen Immunzellen, einschließlich Monozyten, Makrophagen, Mikroglia, T-Helferzellen, CD8⁺-T-Effektor/Gedächtniszellen, natürlichen Killerzellen (NKs), $\gamma\delta$ T-Zellen und DCs exprimiert. Das Fraktalkine ist dabei höchst zell- und organspezifisch. Im Gehirn wird beispielsweise CX₃CR1 nur von Mikroglia exprimiert. Im Darm und im Blut dagegen beschränkt sich die Fraktalkine-Expression auf Monozyten und Makrophagen [108, 110, 111].

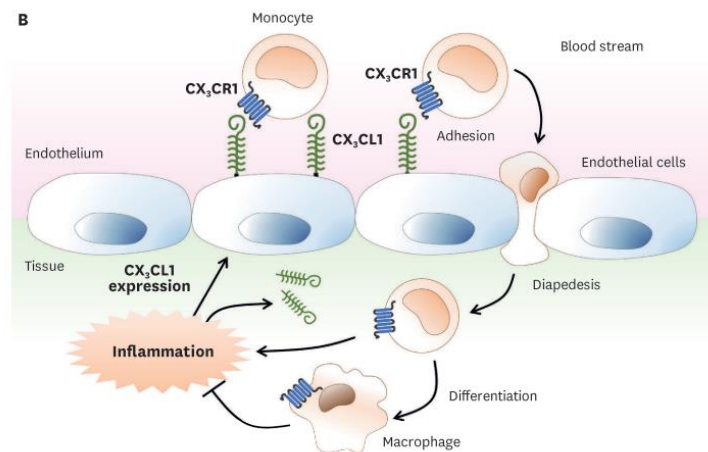


Abbildung 11: Darstellung der Lokalisation des Chemokinrezeptors CX₃CR1 und seines Liganden CX₃CL1 bei der Rekrutierung von Immunzellen

CX₃CL1 wird auf der Oberfläche von Endothelzellen in der Nähe des entzündeten Gewebes exprimiert. CX₃CL1 aktiviert die Chemotaxis und damit die Rekrutierung von CX₃CR1⁺ Immunzellen. Monozyten erkennen das endotheliale CX₃CL1. Nach der CX₃CL1-CX₃CR1-Komplexbildung sind Monozyten im Stande durch Diapedese ins Gewebe zu gelangen. Dort entwickeln sie sich zu Makrophagen, die die Entzündung abschwächen.

Mit freundlicher Genehmigung von The Korean Association of Immunologists und Immune Network [108], Copyright © 2018.

In Abb. 11 ist zu sehen, dass das Chemokin CX₃CL1 in der Nähe eines entzündeten Gewebes auch an der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert wird. Durch die chemokininduzierte Chemotaxis wird die Rekrutierung von CX₃CR1⁺-Immunzellen stimuliert. Monozyten im Blutstrom bilden mit dem endothelialen CX₃CL1 einen Komplex und migrieren ins entzündete Gewebe, wo sie sich schließlich zu Makrophagen differenzieren [108].

Jung et al. generierten im Jahr 2000 den CX₃CR1GFP-Mausstamm, bei dem das CX₃CR1-Gen durch das Green Fluorescent Protein (GFP) ersetzt wurde und das Fraktalkine dadurch von Monozyten, Untergruppen von NK-Zellen, DCs und Mikroglia exprimiert wird. Durch knockout-Experimente mit CX₃CR1^{GFP/GFP}-Mäusen konnte ausgeschlossen werden, dass noch weitere Fraktalkinerezeptoren im murinen Organismus existieren [112]. Durch diese Fraktalkinereportermäuse wurde es der Wissenschaft ermöglicht, sowohl *in vivo* als auch *ex vivo*-Untersuchungen im Zusammenhang mit dem CX₃CR1-Chemokinrezeptor durchzuführen.

3. Ablauf der Immunzellrekrutierung

Eine Aufgabe der Leukozyten im Organismus ist es, im Blutkreislauf zu patrouillieren und auf eindringende Pathogene zu reagieren. Ein grundsätzlicher Prozess der Zellmigration ist die Fähigkeit, mit der Körperzellen von einem Ort zum anderen gelangen. Er ermöglicht Leukozyten eine schnelle und koordinierte Antwort im Rahmen der akuten Immunreaktion [113]. Neutrophile Granulozyten sind die ersten Immunzellen, die sich auf den Weg zum Ort der Verletzung begeben. Sie werden zunächst aus dem Knochenmark mobilisiert und wandern durch den Blutstrom ins Gewebe ein. Fast genauso schnell folgen Monozyten und Makrophagen, welche eine ähnliche Immunreaktion auslösen wie eine Infektion durch Pathogene [20, 28]. Nach dem Eintritt von Pathogenen in den Organismus infiltrieren neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen das infizierte Gewebe und beginnen mit der Elimination. Ebenfalls werden gewebsständige DCs durch die Entzündung aktiviert. Diese detektieren die infektiösen Agenzien, wandern in Lymphknoten ein und stimulieren so die systemische Immunantwort [113]. Monozyten und neutrophile Granulozyten migrieren aus der Zirkulation zum Entzündungsherd, während DCs von der Verletzung in das Lymphsystem wandern [113].

3.1. Rolle der neutrophilen Granulozyten

Neutrophile Granulozyten gehören, neben eosinophilen und basophilen Granulozyten, zur Gruppe der Granulozyten. Sie zeichnen sich durch einen segmentierten Zellkern aus, nehmen im menschlichen Organismus ca. 50 bis 60 % der Gesamtleukozytenzahl ein und gehen aus der myelischen Stammzellreihe hervor [114].

Unter Ruhebedingungen gehen die nach einer Verweildauer von etwa 24 Stunden in der Blutbahn durch Apoptose zugrunde und werden durch Phagozytose von Makrophagen der Milz beseitigt. Neutrophile Granulozyten sind mit Chemokin-Rezeptoren ausgestattet, die es ihnen ermöglichen, Bindungen zu Immunabwehrstoffen herzustellen, um somit ihre Aktivierung einzuleiten. Im Falle einer Entzündung mit einhergehendem chemotaktischem Reiz werden Neutrophile über ihren Chemokin-Rezeptor aktiviert und bewegen sich entlang des chemotaktischen Gradienten zum Entstehungsort des chemotaktischen Reizes [114].

Neben dem Ausschütten von toxischen, antibakteriellen und fungiziden Substanzen, vernichten sie Pathogene durch Phagozytose und Freigabe lysosomaler Enzyme. Dadurch wird der Abbau des Bindegewebes zusätzlich verstärkt, das Komplementsystem aktiviert und die Gerinnungskaskade eingeleitet [114].

Neutrophile Granulozyten zirkulieren im stationären Zustand ständig im Blutstrom und wandern nur zufällig in angrenzendes Gewebe ein [115, 116]. Kommt es zu einer Verletzung des Gewebes, migriert eine große Anzahl neutrophiler Granulozyten in einem mehrstufigen Ablauf auf schnellstem Wege aus dem Gefäß in das umliegende Interstitium (Leukozyten-Adhäsionskaskade) [115, 117, 118]. Durch intravitale Mikroskopie konnte in den letzten Jahren das Migrationsverhalten dieser Zellen in murinen Lymphknoten [119], der Haut [116, 120, 121], der Lunge [122], der Leber [123, 124] und dem Gehirn [125, 126] studiert werden [115].

Perizyten, perivaskuläre Makrophagen und neutrophile Granulozyten selbst ermöglichen es den neutrophilen Granulozyten zusätzlich die verschiedenen Endothelschichten und die darunter gelegene Basalmembran in Bereichen mit wenig Matrixproteinen zu durchqueren [115, 120, 127-129]. Schon nach wenigen Minuten kann ein Einstrom von Neutrophilen ins Gewebe beobachtet werden [116]. Sind sie erst einmal im Interstitium angekommen, können neutrophile Granulozyten sich Integrin-unabhängig im Gewebe bewegen. Dabei folgen sie dem Prinzip des kleinsten Widerstandes [115, 130, 131]. In Abb. 12 ist die vierphasige interstitielle Migration der neutrophilen Granulozyten illustriert:

- (1) Die Scouting-Phase deckt die ersten 15 min nach der Verletzung des Gewebes ab und beschreibt, wie einzelne Neutrophile, angelockt durch DAMPs oder PAMPs, das Gewebe mit zufälligen Migrationsmustern abtasten. Sobald diese die Verletzung aufgespürt haben, wird ihre Bewegung zielgerichteter und sie sammeln sich dort in immer größer werdenden Clustern. Die Clusterbildung wiederum setzt das Neutrophilenschwärmen (neutrophil swarming) in Gang.[115].

- (2) Nach der Initiierung dieses Neutrophileneinstroms, folgt die Phase der Amplifikation, in der eine größere Anzahl von neutrophilen Granulozyten auf schnellstem Wege ins Gewebe übertritt und dort eine hohe Geschwindigkeit und Zielgerichtetheit aufweist [115, 132]. Lämmermann beschreibt in der gleichen Publikation von 2013 zudem, dass im Zentrum der Verletzung zugrunde gehende Neutrophile ebenfalls für die Verstärkung des Neutrophilenschwärmens verantwortlich sein können [132].
- (3) Eine konstante Neutrophilenanzahl und eine langsamere Clusterbildung wird in der Stabilisierungsphase sichtbar: Neutrophilen Granulozyten sezernieren LL-37, Azurozidin und Cathepsin G und dadurch werden langsam migrierenden Monozyten stimuliert. Diese sammeln sich in der Peripherie um die Neutrophilencluster herum an [115, 133]. Zusätzlich wird die Monozytenrekrutierung durch die Umwandlung von Chemokinen durch Serin-Proteasen der neutrophilen Granulozyten stimuliert [115, 134].
- (4) Auf die Phase der Stabilisierung folgt die durch die Apoptose der Neutrophilen bestimmte Resolutionsphase: Makrophagen phagozytieren apoptotische neutrophile Granulozyten durch Efferozytose. Durch diesen Vorgang werden antiinflammatorische Prozesse in Makrophagen ausgelöst und der Metabolismus dadurch umgestellt. Aus proinflammatorischen Mediatoren von Arachidonsäurevorläufern werden proresolutionale Mediatoren, wie zum Beispiel Resolvine, Maresine und Protektine. Durch andere Mediatoren wie Lipoxin A4 und Maresin 1 wird die Neutrophilenmigration gehemmt und so die Zielfindung der Monozyten und Beseitigung der zugrunde gegangenen Neutrophilen gefördert [11, 115, 135]. Der Chemokinrezeptor CCR5 wird durch apoptotische Neutrophile vermehrt sezerniert und verringert so die Anzahl der vorhandenen Chemokine [115, 136]. Auch die Bildung der Neutrophil Extrazellulär Traps (NETs) durch zugrunde gehende Neutrophile spielt eine wichtige Rolle in der Auflösung der Entzündung: Vermehrt vorkommende Serin-Proteasen übernehmen den Abbau von Zytokinen und Chemokinen. Dieser Prozess verhindert ebenfalls den Einstrom von inflammatorischen Zellen in den interstitiellen Raum [115, 137].

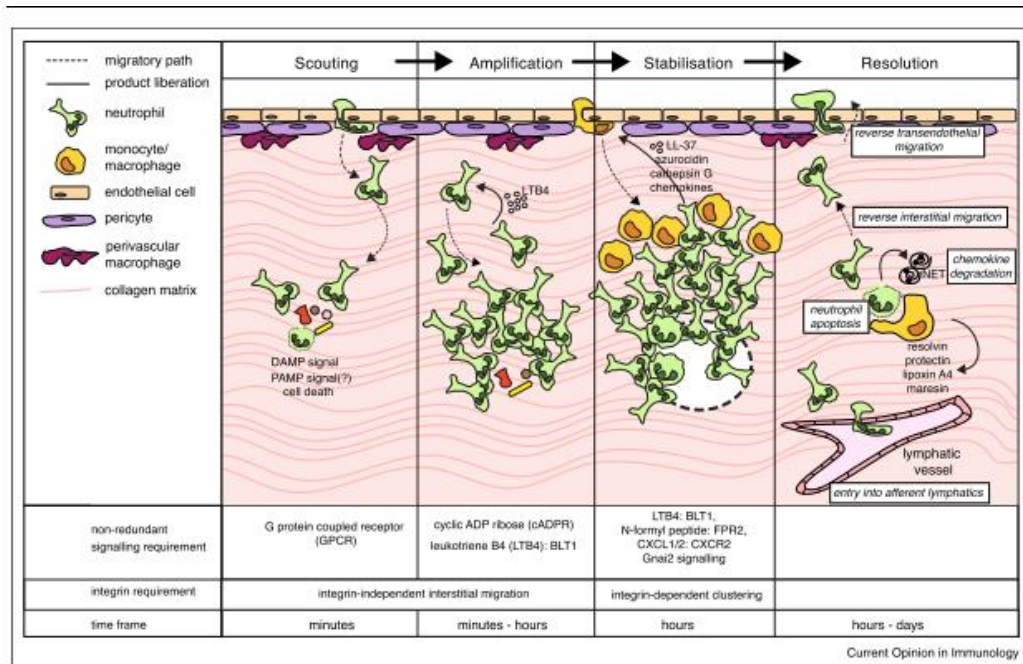


Abbildung 12: Schematische Darstellung der mehrphasigen interstitiellen Migration der neutrophilen Granulozyten

In der Scoutingphase sammeln sich die migrierten neutrophilen Granulozyten in Clustern um die Verletzung. Durch die Amplifikation werden schwarmartig weitere Zellen rekrutiert. Die Phase der Stabilisation ist durch eine konstante Neutrophilenanzahl, Monozyten und eine langsamere Clusterbildung gekennzeichnet. Die anschließende Resolutionsphase führt zu einem antiinflammatorischen Milieu und der Auflösung der Entzündung.

Mit freundlicher Genehmigung von Copyright Clearance Center und Current Opinion in Immunology [115], Copyright © 2017.

Im Zebrafischmodell konnte eine weitere Besonderheit der Neutrophilenmigration in der Auflösungsphase beobachtet werden, die später auch in Säugetieren nachzuweisen war: Die sogenannte „Reverse Migration“ beschreibt das Verhalten der Neutrophilen, wenn sie nach der Extravasation aus dem Gewebe wieder ins Gefäß einwandern [115, 138-144]. Auch der Eintritt der neutrophilen Granulozyten in Lymphgefäße konnte in einem Versuch mit Mykobakterien bestätigt werden. Abadie et al. und Sumaria et al. beschreiben, wie Neutrophile nachdem sie Mykobakterien in der Haut phagozytiert haben bis in die Lymphknoten einwandern konnten [115, 145, 146].

3.2. Rolle der Monozyten und Makrophagen

Sowohl Monozyten als auch Makrophagen werden seit dem Jahr 1972 von van Furth et al. als Teil des Mononuklearen Phagozyten-Systems (MPS) beschrieben [147, 148].

Entzündungsprozesse vieler bekannter kardiovaskulärer Erkrankungen, insbesondere der Atherosklerose, sind durch die Infiltration von Monozyten und Makrophagen gekennzeichnet, die wiederum durch spezifische Differenzierungen die inflammatorischen Prozesse unterstützen [147].

3.2.1. Monozyten in der sterilen Inflammation

Die im Blutstrom zirkulierenden Monozyten sind Zellen mit rundem Kern, die ebenfalls der myeloischen Stammzellreihe entstammen, wie in Abb. 13 dargestellt [114]. Monozyten gelten schon seit Langem als Vorläuferzellen von Makrophagen und dendritischen Zellen (DCs), die sich nach der Migration ins Gewebe in Antigen-präsentierende Zellen (APCs) differenzieren. Sie tragen dort zur Auflösung der Entzündung und Wundheilung bei [110, 149-153]. Durch Zytokine (wie zum Beispiel CCL2) wird die Extravasation und Chemotaxis eingeleitet und durch Phagozytose Infektionserreger eliminiert. Nach der Verdauung präsentieren sie pathogene Antigene auf der Zelloberfläche (durch MHC-II) und aktivieren somit T-Helferzellen [114].

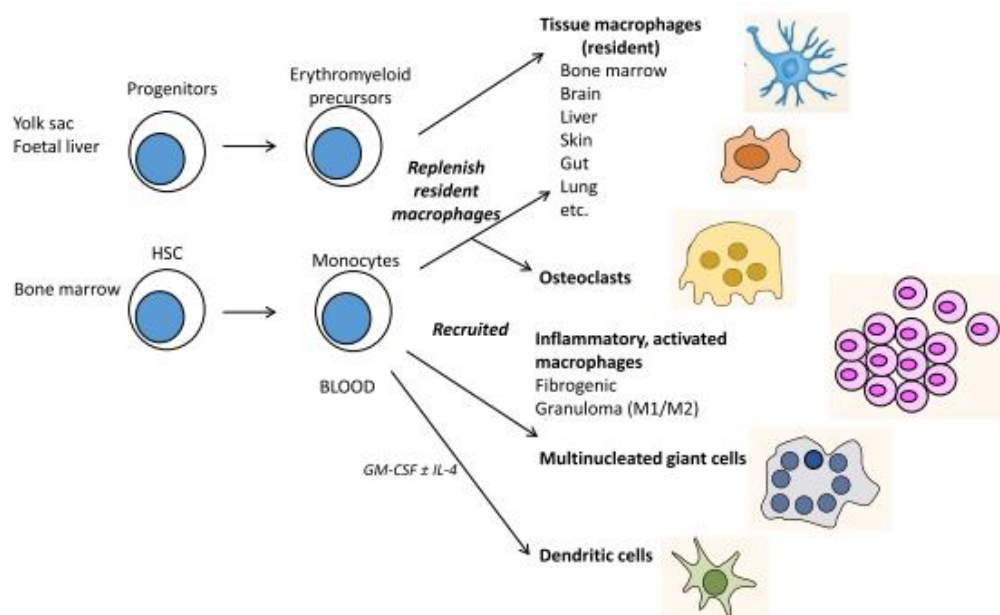


Abbildung 13: Ursprung und Differenzierung von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen

Die Vorläuferzellen von Monozyten stammen aus dem Knochenmark und können sich nach ihrer Differenzierung im Blut zu rekrutierten Makrophagen, Riesenfresszellen und DCs im Gewebe weiterentwickeln.

Mit freundlicher Genehmigung von BMC Biology, Tissue macrophages: heterogeneity and functions [154], Copyright © 2017.

Murine Monozyten werden durch die unterschiedliche Expression von Lymphozyten Antigen 6C (Ly6C) in zwei Populationen unterteilt: Ly6C^{hi}-Monozyten zeigen proinflammatorische und antimikrobielle Funktionen und verfügen über eine große Menge an CC-Chemokinrezeptor 2 (CCR2) und niedrige Mengen an CX₃C-Chemokinrezeptor 1 (CX₃CR1; CCR2^{hi}CX₃CR1^{low}). Diese Monozyten sammeln sich am Ort der Entzündung und transportieren Antigene zu den Lymphknoten. Dort können sie sich Zytokin-abhängig in Makrophagen oder DCs differenzieren [149, 150, 155].

Ly6C^{low}-Monozyten patrouillieren in den Gefäßen und suchen die Gefäßwände durch Crawling nach Hinweisen auf Entzündungen und Heilungsprozesse ab. Diese Monozyten wiederum exprimieren viel CX₃CR1, aber wenig CCR2 (CX₃CR1^{hi}CCR2^{low}). Im Menschen dagegen werden drei Monozytenpopulationen aufgrund ihrer Expression von CD14 (ein Bestandteil des Lipopolysaccharid-Komplexes) und CD16 (FCγRIII Immunglobulin Rezeptor) beschrieben: klassische Monozyten (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediäre Monozyten (CD14⁺CD16⁺) und nichtklassische Monozyten (CD14⁺CD16⁺⁺) [149, 156-159]. Dabei entsprechen die humanen klassischen Monozyten den murinen Ly6C^{hi} Monozyten und humane nichtklassische Monozyten der murinen Ly6C^{low} Population [149].

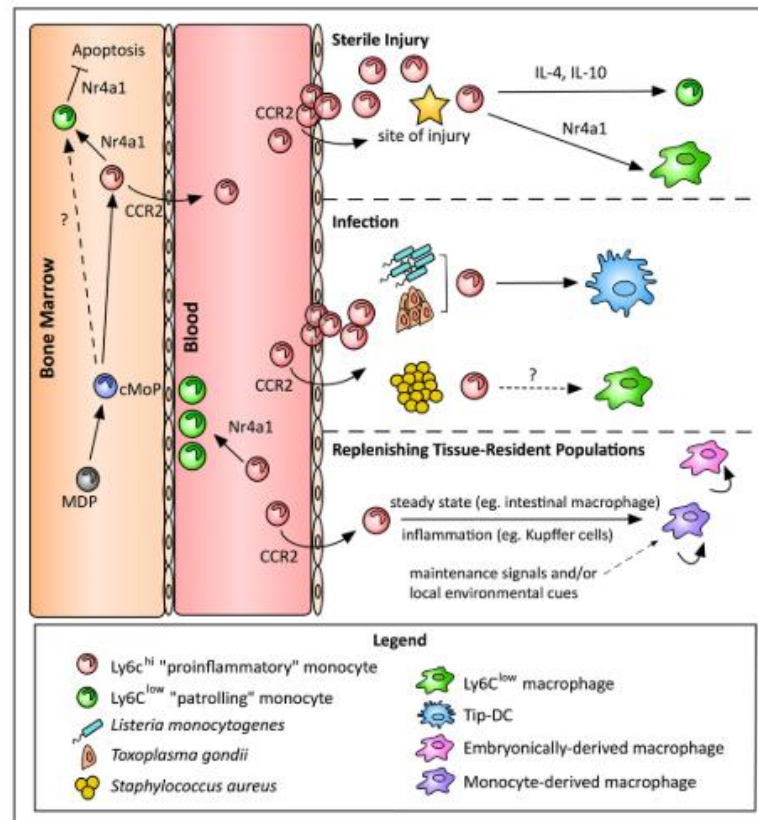


Abbildung 14: Das Schicksal der Makrophagen während der sterilen Inflammation

Während der sterilen Inflammation differenzieren sich proinflammatorische Monozyten in Ly6C^{low} patrouillierende/reparierende Monozyten oder in Ly6C^{low} alternative Makrophagen.

Mit freundlicher Genehmigung von Copyright Clearance Center und Wolters Kluwer Health, Inc [149], Copyright © 2016.

Kommt es zu einer sterilen Entzündung im umliegenden Gewebe, treten Monozyten direkt nach den neutrophilen Granulozyten aus dem Gefäß in das entzündete Gewebe über und nehmen eine Schlüsselrolle in der Abwehr von Krankheitserregern und Entzündungsprozessen ein [117, 149]. Unter dem Einfluss des Transkriptionsfaktor Nr4a1 entwickeln sich Ly6C^{low} patrouillierende Monozyten entweder aus dem Blut oder aus dem Knochenmark [149, 160]. Die Monozyten im Blutstrom überwachen durch ständigen Kontakt mit dem Endothel den Immunstatus des Organismus und treten CCR2-abhängig ins entzündete Gewebe über. [149, 161]. In Abb. 14 ist zu sehen, dass sie sich dort interleukin- oder Nr4a1-abhängig in Ly6C^{low} patrouillierende Monozyten oder Ly6C^{low} alternative Makrophagen differenzieren können [149, 162].

3.2.2. Aufgabe und Heterogenität der Makrophagen

Zuerst entdeckt durch den Nobelpreisträger Elie Metchnikoff im Jahr 1882, stellen Makrophagen ein andauerndes Forschungsgebiet dar.

Makrophagen kommen in fast allen Gewebsarten vor. Dort sind sie für die Überwachung und die Detektion von Signalen des Mikroumfeldes zuständig. Durch spezielle Differenzierungs- und Polarisierungsprogramme passen sie sich an die wechselnden Bedingungen des Gewebeumfeldes an. Adaptiert an die anatomischen Gegebenheiten, sind sie in ihrer Funktion außerordentlich hoch spezialisiert und spielen eine tragende Rolle in physiologischen Prozessen des gesunden Gewebes [163].

Im Laufe einer Entzündung werden immer mehr DAMPs oder PAMPs durch nekrotische Zellen ins Gewebe abgegeben und durch eine steigende Anzahl apoptotischer migrierter neutrophiler Granulozyten ergänzt. Die Phagozytose apoptotischer Zellen ist bereits in der Homöostase des gesunden Gewebes ein wichtiger Bestandteil. In der Auflösung der Entzündung nehmen Makrophagen eine elementare Rolle ein: Die Phagozytose von neutrophilen Granulozyten initiiert die Deaktivierung und die Expression von antiinflammatorischen Mediatoren und Wachstumsfaktoren und aktiviert so die Heilungsprozesse [7, 164-167]. Makrophagen können ihren Status von einem proinflammatorischen in einen antiinflammatorischen Status ändern (Polarisierung) [168].

Obwohl viel Forschungsarbeit zur Herkunftsbestimmung der Makrophagen betrieben wurde, konnte die Gesamtheit der Komplexität dieser heterogenen Zellpopulation noch nicht einheitlich bestimmt werden. Neuere Publikation aus den Jahren 2010 (Ginhoux et al.) und 2017 (Rodriguez und Gurtner) postulieren, dass sich nicht alle Makrophagen konstant aus dem, durch Hämatopoese entstandenen Monozytenpool, ableiten [169-172]. Stattdessen fand man heraus, dass eine dynamische Balance zwischen zwei ursprünglichen Makrophagenpools herrscht [169]. Die gewebsständigen Makrophagen (resident macrophages) stammen von myeloischen Progenitorzellen (erythromyeloid progenitors, EMPs) aus dem Dottersack ab und persistieren in reifen Geweben [171-173]. Gleichzeitig existiert ein Vorkommen an Makrophagen, die sich aus dem Knochenmark stammenden Monozyten entwickelt haben sollen [155, 169, 170, 172-174] – veranschaulicht ist dieser Vorgang in Abb. 15.

Malissen, Tamoutounour und Henri [174] fassen in ihrer Publikation zusammen, dass Makrophagen sich pränatal aus dem Dottersack entwickeln [171, 172] und sich nach der Geburt von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark erneuern [155, 175]. Die Unterschiede in der Herkunft der Makrophagen weist möglicherweise einen Zusammenhang mit ihren spezifischen Funktionen auf [169].

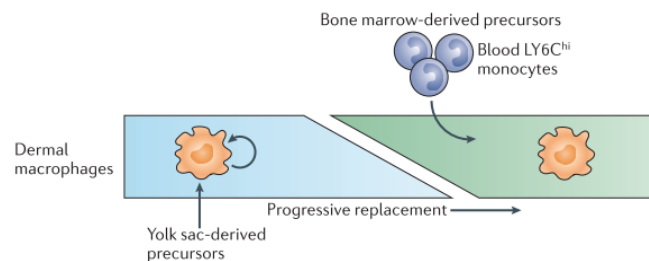


Abbildung 15: Herkunft gewebständiger Makrophagen der Haut

Gewebständige dermale Makrophagen finden ihren Ursprung schon bereits vor der Geburt im Dottersack, während sie im Laufe der Zeit eine kontinuierliche Erneuerung durch, aus dem Knochenmark abstammende, Ly6C^{hi} Monozyten aus dem Blut erfahren.

Mit freundlicher Genehmigung von Copyright Clearance Center und Springer nature [174], Copyright © 2014.

In Abb. 16 ist zu sehen, dass Makrophagen historisch (basierend auf *in vitro* Versuchen) in zwei Gruppen eingeteilt werden können: M1-Makrophagen werden durch eindringende Pathogene, Lipopolysaccharide (LPS) oder Interferon γ (IFN γ) aktiviert und sezernieren proinflammatorische Zytokine. Dagegen werden M2- Makrophagen durch Interleukine (IL-4 und IL-13) und TGF β stimuliert, schütten antiinflammatorische Zytokine aus und tragen zur Wundheilung bei [114, 169, 176, 177].

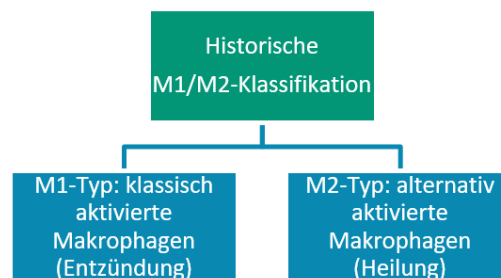


Abbildung 16: Historische Einteilung der Makrophagen

Historisch wurden die Makrophagen in M1-Typ und M2-Typ-Makrophagen eingeteilt. Klassisch aktivierte Makrophagen sind demnach an Entzündungsprozessen beteiligt, während alternativ aktivierte Makrophagen in der Heilung eine Rolle spielen.

Darüber hinaus gilt die allgemeine Auffassung, dass noch weitere Untergruppen existieren. Einige dieser Zellen tragen zur Gewebshomöostase und der Wiederherstellung der Integrität des Gewebes bei, andere wiederum verschlimmern die Entzündungssymptome [169].

Die historische Einteilung wurde daher neu vorgenommen: In Abb. 17 ist die aktuelle Auffassung der Einteilung der Makrophagen bezüglich ihrer Herkunft, aktivierende Stimuli, der Expression verschiedener Antigene und Rezeptoren zu sehen. Darüber hinaus ist auch der experimentelle Kontext im Zusammenhang mit den Eigenschaften wichtig.

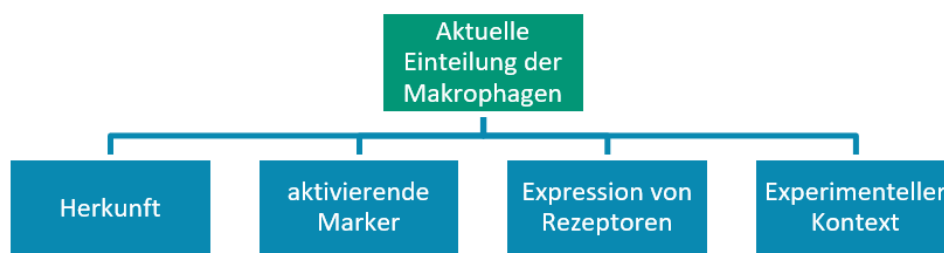


Abbildung 17: Darstellung der aktuellen Einteilung der heterogenen Makrophagenpopulation

Die aktuelle Einteilung der heterogenen Makrophagenpopulationen wird aufgrund ihrer Herkunft, den aktivierenden Stimulanzen, der Expression von Oberflächenrezeptoren und dem experimentellen Kontext vorgenommen. Darstellung nach Murray et al. 2014 [178].

Die Expression von Antigenen gewebsständiger Makrophagen beschreiben Gordon und Plüddemann in einem aktuellen Review aus dem Jahr 2017: Die Membranrezeptoren F4/80 und CD68 stellen nützliche Bindungsdomänen für markierende Antigene in der immunhistochemischen Fluoreszenzfärbung dar [154]. F4/80 ist ein etablierter monoklonaler Antikörper aus dem Jahr 1981, der bis heute noch regelmäßig in Untersuchungen des MPS herangezogen wird [179-184]. Murines CD68 (oder auch Makrosialin) stellt ein Glykoprotein dar, das in großem Vorkommen auf Zelloberfläche von Makrophagen und anderen Vertretern des MPS zu finden ist [185]. Es wird geschätzt, dass 5000 CD68-Moleküle auf der Zelloberfläche von Makrophagen exprimiert werden können [185, 186]. Weitere Studien konnten zeigen, dass auch Zellen, die nicht aus dem Knochenmark stammen, CD68 in geringerem Ausmaß exprimieren [185, 187].

3.2.3. Gewebsständige Makrophagen in kardiovaskulären Erkrankungen

Gewebsständige Makrophagen sind im kardialen Interstitium, großen Arterien und Venen und im peripheren vaskulären System als perivaskuläre Zellen zu finden. Während einer Entzündung, Heilungsprozessen, Infektion, Atherosklerose und malignen Erkrankungen stehen sie in enger Zusammenarbeit mit dem Endothel [154, 188]. Kardiale Makrophagen, die embryonalen Ursprungs sind, werden mit der Zeit durch Monozyten aus dem Knochenmark, ausgetauscht [154, 189, 190]. In einer weiteren aktuellen Studie aus dem Jahr 2017 zeigten Hulsmans et al., dass Makrophagen die elektrische Leitfähigkeit im Herzen bereitstellen [191]: Gewebsständige Makrophagen sind in großer Anzahl sowohl im murinen als auch im humanen AV-Knoten zu finden; Connexin 43 verändert hierbei die elektrische Aktivität der Kardiomyozyten. Wurden die Makrophagen aus dem Gewebe entfernt, so kam es zur Induktion von atrioventrikulären Blockaden (AV-Blocks) [154, 191]. Nach einem Myokardinfarkt spielen rekrutierte Monozyten eine Schlüsselrolle in der Durchlässigkeit des Gewebes, der Angiogenese und Narbenbildung [154]. Libby, Nahrendorf und Swirski erschufen durch eine weitere Studie den Zusammenhang des Entzündungsnetzwerkes von Gehirn, autonomen Nervensystem, Knochenmark und Milz mit atherosklerotischer Plaquebildung und Infarzierung [154, 192]. Anhand eines murinen Modells (chronisches Herzversagen nach Ligatur der Koronararterie) konnten Nahrendorf et al. beobachten, dass einige, von Monozyten abstammende, M2-Makrophagenpopulationen (die zuvor unter Ruhebedingungen in kardialen Gewebe nachgewiesen wurden) zur Besiedelung nicht-ischämischer Regionen durch myokardiale Makrophagen beitrugen [176]. Dies ist durch lokale Proliferation, CCR2-abhängige Rekrutierung und Hämatopoese außerhalb des Knochenmarks möglich [176]. Darüber hinaus ist dieser Vorgang von der Aktivierung des sympathischen Nervensystems abhängig [154, 193].

3.2.4. Gewebsständige Makrophagen der Haut

Die Haut stellt das größte Organ des Körpers dar und fungiert als Schnittstelle zwischen Organismus und der Umwelt, sowie als biologische Barriere gegen chemische, physische und pathogene Reize [194, 195].

Sie lässt sich in zwei Bereiche einteilen: die Epidermis, eine nicht vaskularisierte Schicht, die vorrangig von Keratinozyten besiedelt ist, und die fibroblastenreiche Dermis, die ihre Widerstandsfähigkeit und Elastizität durch Kollagen- und Elastinfasern aufrechterhält [194, 195].

Die Epidermis, welche die äußerste hydrophobe Hautschicht darstellt, besteht aus einem mehrschichtigen Plattenepithel, Haarfollikeln und Hautanhangsgebilden (siehe Abb. 18). Langerhans-Zellen (LCs) residieren dort als gewebsständige Makrophagen. Sie sind für den intrazellulären Umbau der eingedrungenen Antigene zuständig und präsentieren im Anschluss die Antigene an ihrer Oberfläche [169]. T-Helferzellen nehmen mit den Langerhans-Zellen Kontakt auf, migrieren aus der Epidermis in die vaskularisierte Dermis und aktivieren so das Immunsystem [196].

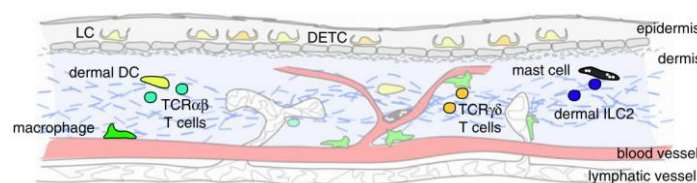


Abbildung 18: Schematisierte Illustration des Immunnetzwerkes der Haut

Die oberste Schicht der Haut stellt die Epidermis mit Langerhans-Zellen (LCs) und dendritischen epidermalen T-Zellen (DETCs) dar. In der Dermis sind dermale DCs, Makrophagen, T-Zellen und Blut- und Lymphgefäße zu finden.

Mit freundlicher Genehmigung von Creative Commons Attribution License [194], Copyright © The author(s) 2013.

Die Dermis schließt sich in der Tiefe an die Epidermis an und ist reich an extrazellulärer Matrix. Das *Stratum papillare* grenzt sich von der Epidermis durch die Basalmembran ab. Die eine Schicht darunter liegende Struktur des *Stratum reticulare* ist stark vaskularisiert und beherbergt sowohl Makrophagen als auch Antigen-Präsentierende Dendritische Zellen, die schwer voneinander abzugrenzen sind [169, 197]. Die Aufgabe dermalen Makrophagen unter Ruhebedingungen ist es, sowohl zellulären Zerfall und Zersetzung von Makromolekülen, als auch Mikroorganismen in der Haut zu detektieren. Im Gegensatz zu dendritischen Zellen haben Makrophagen nur ein geringes Vermögen zur Präsentation von Antigenen und sind somit nicht in der Lage, T-Helferzellen zu aktivieren, damit diese in Lymphknoten einwandern können [169, 175].

Die Hypodermis (oder auch Subkutis) stellt die unterste Schicht der Dermis dar und ist durch Adipozyten und lockeres, vaskularisiertes Bindegewebe gekennzeichnet. Unter Ruhebedingungen beträgt der Anteil der Makrophagen im subkutanen Fettgewebe fünf Prozent der gesamten Zellzahl [169, 198].

Durch den großflächigen Kontakt der Haut mit der Umwelt ist das spezifische und unspezifische Immunsystem besonders gut entwickelt: Das Immunnetzwerk der Haut besteht hauptsächlich aus gewebsständigen Phagozyten, Antigen-Präsentierenden Zellen, Mastzellen, T-Lymphozyten und Lymphzellen des angeborenen Immunsystems [194].

Makrophagen bilden eine besonders vielfältige und heterogene Zellpopulation, die in fast allen Geweben, inklusive der Haut, zu finden ist [194, 199]. Sie stellen unter Ruhedingungen die größte Population der hämatopoetischen Stammzellen in der Haut dar und sind für deren Intaktheit und Funktionalität zuständig [194, 200, 201]. In der Haut können sie aufgrund ihrer Position im Gewebe in epidermale, dermale und hypodermale Makrophagen differenziert werden [169].

Auf welche Art und Weise sich kutane, gewebsständige Makrophagen unter Einfluss von Entzündungen verändern, stellt ein weites aktives Gebiet in der Forschung dar [169]. Mowat, Scott und Bain vertreten in einer Publikation aus dem Jahr 2017 die Meinung, dass Makrophagen in ihrer Aufgabe als Wachposten, eingedrungene Pathogene detektieren und daraufhin eine Vielzahl an Genen exprimieren, die zur Tötung von Mikroorganismen und Stimulierung der Phagozytose führen [175, 202].

3.2.5. Interaktion von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten

Die Apoptose von Leukozyten ist charakteristisch für die sich selbst limitierende, akute und durch Verletzung oder Infektion entstandene Entzündung. Es besteht die Annahme, dass apoptotische Zellen zur Selbstaflösung der Entzündung beitragen, indem sie gewebsständige Makrophagen vom proinflammatorischen in den antiinflammatorischen Zustand umprogrammieren [8, 203]. Gewebsständige Makrophagen spielen im Organismus durch ihre Funktion als Wachposten des Immunsystems eine wichtige Rolle und stellen die ersten Immunzellen dar, die durch Produktion von Zytokinen die Neutrophilenmigration einleiten [8, 136].

Innerhalb von Minuten infiltrieren neutrophile Granulozyten das verletzte Gewebe. Nach der Phagozytose gehen sie durch Apoptose zugrunde und verbleiben dort als Zelltrümmerhaufen. Der Zeitpunkt, an dem die meisten Neutrophilen aus dem Gefäß ausgetreten sind, ist gleichzeitig auch der Beginn des selbstlimitierenden Abschnitts der Entzündung [8, 203]. Zu diesem Zeitpunkt ist auch die größte Anzahl an akkumulierten apoptotischen Neutrophilen zu beobachten, die während der Resolutionsphase von Makrophagen durch Efferozytose beseitigt werden [8, 204]. Diese Beobachtungen stützen die Theorie, dass die Efferozytose von apoptotischen Neutrophilen durch gewebsständige Makrophagen eine wichtige Komponente im Zusammenhang mit dem Beginn der Auflösung der Entzündung darstellt [8, 165, 205].

Darüber hinaus ist bekannt, dass Makrophagen durch neutrophile Granulozyten in der Lage sind, das intrazellulär vorkommende Pathogen *Leishmania braziliensis* zu eliminieren [115, 206]. In einer durch LPS stimulierten Peritonitis konnte gezeigt werden, dass gewebsständige Makrophagen und Mastzellen gemeinsam die Migration der neutrophilen Granulozyten im Peritoneum kontrollieren.

Im gleichen Zug konnte auch bewiesen werden, dass durch die Depletion von Makrophagen die interstitielle Migration von neutrophilen Granulozyten, aber nicht der Prozess der Extravasation, erschwert wird [115, 207]. Perivaskuläre Mastzellen und Makrophagen des Peritoneums geben somit räumlich getrennte chemoattraktive Hinweise auf eine Kooperation in der Rolle des Wegweisers für neutrophile Granulozyten zum Ort der Entzündung [115].

Schiwon et al. beschrieben im Jahr 2014 in einer Harnwegsinfektion mit *Escherichia coli* (UPEC), dass die Migration von neutrophilen Granulozyten auch durch gewebsständige Makrophagen und eingewanderte rekrutierte Makrophagen orchestriert wird [208]. Sie postulieren in der gleichen Publikation, dass eine Art Arbeitsteilung zwischen gewebsständigen Ly6C⁻ Makrophagen, eingewanderten Ly6C⁺-Makrophagen und migrierenden neutrophilen Granulozyten besteht: Ly6C⁻-Makrophagen sind auf die Produktion von Chemokinen spezialisiert, Ly6C⁺-Makrophagen unterstützen den Prozess durch die Sekretion von TNF. Neutrophile Granulozyten übernehmen die Aufgabe der Eliminierung der Erreger [115, 208].

Diese These wird durch eine weitere Publikation aus dem gleichen Jahr über perivaskuläre Makrophagen von Abtin et al. gestützt: Die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in einer Infektion mit *Staphylococcus aureus* wird maßgeblich durch die Chemokinproduktion der perivaskulären Makrophagen gesteuert. Der Virulenzfaktor α -Hämolysin stimuliert diese Zellen zur Lyse und hemmt somit die Auswanderung der neutrophilen Granulozyten und die Elimination des Pathogens [115, 120]. Darüber hinaus wurde in der gleichen Publikation eine Untergruppe perivaskulärer Makrophagen beschrieben, die durch verlängerte Zellfortsätze und ihre dendritische Form auffielen. Durch ihre perivaskuläre Position (rund um postkapilläre Venolen) interagieren sie mit Neutrophilen während der Extravasation. Es wurden Hotspots an den Teilen der Gefäße beobachtet, an denen auch perivaskuläre Makrophagen positioniert waren. An diesen Hotspots traten Neutrophile bevorzugt in das Gewebe über [115, 120].

3.3. Rolle dendritischer Zellen in der sterilen Inflammation

Dendritische Zellen gehören genauso wie Makrophagen zum MPS und spielen ebenfalls eine wichtige Rolle in Gewebshomöostase und Krankheitsverlauf. Sie gehören zur Gruppe der APCs, stammen von hämatopoietischen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ab und sind im ganzen Körper anzutreffen. Durch ihre einzigartige Fähigkeit der T-Zell-Aktivierung durch Bindung, Prozessierung und Präsentation von Antigenen, nehmen sie eine zentrale Position im erworbenen Immunsystem ein [209, 210]. Die Population der DCs in der Haut wird eingeteilt in plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs), konventionelle dendritische Zellen (cDCs) und von Monozyten abstammende DCs [174].

In der untenstehenden Tabelle haben Lech et al. eine Gegenüberstellung von gewebständigen DCs und Makrophagen erstellt, die eine enge Verzahnung der Funktionen unter Ruhebedingungen und Krankheitsprozessen aufzeigt [7].

Tabelle 1: Aufgaben gewebständiger dendritischer Zellen und Makrophagen in Homöostase und Krankheitsprozessen. Tabelle nach Lech et al 2012.

	Gewebständige dendritische Zellen	Gewebständige und infiltrierende Makrophagen
Homöostase	<ul style="list-style-type: none"> • Aufnahme von Antigenen (AG) und Prozessierung • Migration in regionale Lymphknoten • AG-Präsentation für T-Zellen 	<ul style="list-style-type: none"> • Phagozytose von Zelldebris und Pathogenen • Eliminierung von nekrotischen Zellen • Umorganisation der extrazellulären Matrix
Krankheit	<ul style="list-style-type: none"> • AG-Präsentation in der Niere • Lokale Sekretion von Zytokinen • Formierung der lokalen Immunantwort für periphere Toleranz 	<ul style="list-style-type: none"> • Immunabwehr des Gewebes • Auflösung der Entzündung • Wundheilung durch parenchymale Reparatur/Narbenbildung

Christ et al. geben in ihrer Publikation einen Überblick über die Einflussmöglichkeiten von DCs in kardiovaskulären Krankheitsprozessen: Risikofaktoren wie Diabetes, Bluthochdruck oder Atherosklerose rufen Organschäden (Schlaganfall, Herzversagen oder verschlossene Arterien) hervor und beeinflussen die Aktivierung und Differenzierung von DCs [209].

TLRs und CLRs gehören zu den zwei am meisten vertretenen PRR Familien, die unter anderem von Makrophagen und DCs exprimiert werden. DNCR-1 (dendritic cell NK lectin group receptor-1), auch unter dem Namen Clec9a bekannt, ist ein TypII-Transmembran CLR, der vor allem bei $CD8\alpha^+$ -DCs als ein Rezeptor für nekrotische Zellen agiert [211]. Obwohl dieser Rezeptor für die Phagozytose nicht essentiell ist [212], ist das DNCR-1 dafür verantwortlich, dass Antigene via Endozytose binden können und direkt zu den Endosomen für die Präsentation von Antigenen nekrotischer Zellen durch $CD8\alpha^+$ -CDs geleitet werden [211, 213, 214].

Schraml et al. konnten 2013 in einem transgenen Mausmodell Clec9a-Cre;Rosa26-tomato;CX₃CR1GFP den Rezeptor DNCR-1 sichtbar machen. So konnten Vorläufer von cDCs durch die Expression des DNCR-1 Rezeptors markiert werden und sich von anderen Leukozytenpopulationen abgrenzen [215].

Das Integrin alphaX (ITGAX) ist auf der Zelloberfläche von DCs zu finden. ITGAX, oder auch CD11c, wurde als dendritischer Zellmarker in der Vergangenheit etabliert und markiert klassische DCs in atherosklerotischen Plaques. Neben DCs ist er auch auf gewebsständigen Makrophagen, NKs, NK T-Zellen und Untergruppen von T- und B-Zellen zu finden [209, 216]

4. Visualisierung der Prozesse der sterilen Inflammation

Die Untersuchung der Prozesse der sterilen Inflammation in Bezug auf das Gefäßsystem lässt sich *ex vivo* durch immunhistochemische Fluoreszenzfärbungen und *in vivo* durch Intravitalmikroskopie in verschiedenen Organmodellen durchführen.

4.1. Die sterile Inflammation im Ohrmodell

Vor ca. zehn Jahren wurde das murine Ohrmodell zuerst von Roediger et al. und Ng et al. im Zusammenhang der Visualisierung von Migrationsverhalten dermalen DCs beschrieben [217, 218]. Durch die leichte Zugänglichkeit, fehlendes Haarkleid und die minimalinvasive, einfache Präparation sind intravitalmikroskopische Aufnahmen von vielen Stunden möglich. Darüber hinaus wird das Bild wenig von respiratorischen Bewegungen gestört [217].

Durch eine Fokussierung des Lasers im 2-Photonen-Mikroskop wird eine autofluoreszierende nekrotische Verletzung im Gewebe erzielt [128, 219, 220]. Die Laserverletzung simuliert auf diese Weise ein Areal untergegangenen Gewebes. Immunzellen des angeborenen Immunsystems erkennen diese als sterile Inflammation und starten die Immunkaskade.

4.2. Weitere Modelle der sterilen Inflammation

Neben dem oben beschriebenen Ohrmodell gibt es weitere Modelle, um die sterile Inflammation in der Mikrozirkulation zu studieren und zu visualisieren:

In den letzten 25 Jahren war die sterile Entzündung der Leber ein häufig genutztes experimentelles Modell für die Forschung auf dem Gebiet der Immunologie [221-225]. In einer Vielzahl von Erkrankungen konnte festgestellt werden, dass akutes oder chronisches Leberversagen die Anfälligkeit für Infektionen drastisch erhöht [221]. Auch der Reperfusionsschaden nach einer Ischämie der Leber nach Teilresektionen oder Transplantationen kann mit diesem Modell analysiert werden.

McDonald und Kubers und Menezes et al. zeigten in einer fokalen Nekrose (induziert durch eine thermische Verletzung der Leberoberfläche), dass die Rekrutierungsbewegung der Neutrophilen sich stark von der, in einer septischen Inflammation erzeugten, unterschied [123, 226, 227].

Ein weiteres Modell zur Investigation der Prozesse der sterilen Inflammation im vaskulären Kontext bietet das Cremaster-Model: Durch die Präparation des *Musculus cremaster* als ein dünnes Häutchen können *in vivo*-Aufnahmen der muskulären Mikrozirkulation erstellt werden [228, 229].

Auch die akute Pankreatitis ist als ein potenzielles Modell aufzuführen: Durch die Nekrose von Azinuszellen und Adipozyten entsteht eine initiale sterile Inflammation. Die frühe Reaktion auf die Pankreasnekrose ist wegweisend für den nachfolgenden Krankheitsverlauf und die Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen, die Stimulierung einer lokalen und systemischen Entzündung und die Morbidität [230-232]

III. ZIELSETZUNG

1. Untersuchung der Rolle gewebständiger CX₃CR1⁺ - Zellen und ihr Zusammenspiel mit neutrophilen Granulozyten unter Bedingung einer sterilen Inflammation *in vivo*

Hier soll die Rolle der gewebständigen CX₃CR1⁺-Zellen bis zu fünf Stunden nach Induktion einer sterilen Entzündung analysiert werden. Es gibt wenig Informationen über das Verhalten von CX₃CR1⁺-Zellen im Gewebe; sie sind größtenteils immobil und weisen keine Veränderung in der Anzahl oder Morphologie auf. Die Möglichkeiten zur Beobachtung und Analyse ihrer Aktivierungsstadien *in vivo* sind stark begrenzt.

Des Weiteren soll die Interaktion der neutrophilen Granulozyten mit gewebständigen CX₃CR1⁺-Zellen analysiert werden.

2. Untersuchung der Auswirkungen der Neutrophilendepletion auf die gewebständigen CX₃CR1⁺ - Zellen in der sterilen Inflammation *in vivo*

In diesem Teil der Arbeit soll die Interaktion der neutrophilen Granulozyten in Zusammenhang mit gewebständigen CX₃CR1⁺-Zellen beleuchtet werden. Hierbei sollen mittels eines Antikörpers die neutrophilen Granulozyten im Blut depletiert und deren Einfluss auf das Verhalten der gewebständigen CX₃CR1⁺-Zellen beobachtet werden.

3. Mechanismen der Dendritenbildung in gewebständigen CX₃CR1⁺ - Zellen *in vivo*

HMGB1 stellt einen wichtigen Entzündungsmediator im Gewebe dar, der nicht nur passiv durch nekrotische Zellen sezerniert, sondern auch aktiv durch Entzündungszellen freigelassen wird.

Hier sollen durch Gabe von HMGB1 die Mediatoren der sterilen Entzündung verstärkt und das Verhalten gewebsständiger CX₃CR1⁺-Zellen analysiert werden. Im Gegensatz dazu wirkt BoxA inhibierend auf HMGB1.

Daher soll in weiteren Versuchen der Neutrophileneinstrom ins Gewebe und das Verhalten der gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen untersucht werden.

4. Bestimmung der Herkunft gewebsständiger CX₃CR1⁺ - Zellen durch Knochenmark-Transplantation *in vivo*

Da gewebsständige, sich nur langsam erneuernde Makrophagen entweder dem Knochenmark entstammen oder ihren Ursprung im Dottersack haben, soll durch eine Transplantation des Knochenmarks ergründet werden, welcher Herkunft die gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen zuzuordnen sind.

5. Charakterisierung gewebsständiger CX₃CR1⁺ - Zellen in der sterilen Inflammation *ex vivo*

Da der Fraktalkin-Rezeptor allein zu wenig Informationen über die gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen bietet, sollen diese durch immunhistochemische Färbungen mit verschiedenen Antikörpern gezielt charakterisiert werden. Hierbei sollen Antikörper gegen Oberflächenmoleküle der gewebsständigen Makrophagen sowie dendritischen Zellen verwendet werden.

Um die Charakterisierung der gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen weiter voranzubringen, wurde das Clec9a-Cre;Rosa26-tomato;CX₃CR1GFP-Mausmodell herangezogen. Unter Bedingungen einer sterilen Entzündung sollen die Interaktionen von Clec9a⁺-dendritischen Zellen mit gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen untersucht werden.

IV. MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchstiere

Die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden am Versuchstier Maus vorgenommen. Da die Maus immunbiologisch gut charakterisiert ist, eignet sie sich hervorragend als Modelltier sowohl für intravitalmikroskopische Untersuchungen als auch für immunhistologische Analysen. Die Auswahl an transgenen Linien und die kurzen Generationswechsel untermauern die Wahl dieser Tierart zusätzlich.

Um die Rolle von gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen in der sterilen Entzündung im Zusammenspiel mit neutrophilen Granulozyten zu untersuchen, wurden drei Mauslinien und Modelle verwendet, deren Eigenschaften im Folgenden näher beschrieben werden.

Das Versuchsvorhaben wurde von der Regierung von Oberbayern gemäß §8 des Deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG. in der Fassung vom 18.Mai 2006, letzte Änderung am 29.03.2017 durch Artikel 141) durchgeführt und genehmigt (Aktenzeichen 55.2-2532-13-197).

1.1. Tierhaltung, Zucht und Hygienemanagement

Die Tiere, die für diese Arbeit verwendet wurden, wurden eigens für dieses Versuchsvorhaben in der Tierhaltung der Medizinischen Klinik und Poliklinik I, Zentrum für Neuropathologie und Prionenforschung (ZNP), Klinikum Großhadern, LMU, Marchioninistraße 27, 81377 München bzw. in der Tierhaltung des Walter-Brendel-Zentrums für Experimentelle Medizin, Marchioninistraße 27, 81377 München gezüchtet.

In der Tierhaltung des ZNPs erfolgte die Haltung und Zucht der Mäuse unter SPF-Bedingungen (Specific-Pathogen-Free), mit geschlossenem Barriersystem (Personalschleuse, Materialschleuse, Durchreichautoklav, Wasserstoffperoxidschleuse, Überdruckbelüftung). Die Käfige wurden einmal pro Woche gewechselt, mit 80 °C heißem Wasser gewaschen und anschließend bei 121 °C autoklaviert. Die Mäuse wurden in einem IVC-System (Individually Ventilated Cabinet, THKB-M2V-M Polysulfonkäfige, Typ M II, verlängert) gehalten, mit einer Besetzung von maximal drei Tieren in einem Käfig.

Beim Umsetzen durften die Käfige ausschließlich unter einer Umsetzstation geöffnet werden. Die Tiere wurden mit Standardfutter für Labornager (Haltungsfutter V 1536) *ad libitum* gefüttert; Wasser stand aus Trinkflaschen ebenfalls unbegrenzt zur Verfügung. Das Einbringen von Einstreu und Wasser in die Tierhaltung erfolgte nur nach vorheriger Autoklavierung. Die Raumtemperatur betrug ca. 21 °C und die Luftfeuchte ca. 55%. Für die Beleuchtung im Tag-Nacht-Rhythmus wurde ein Lichtprogramm über einen Zeitschalter im zwölf StundenTakt eingesetzt. Mit Hilfe von Sentinel-Mäusen wurde der SPF-Status der Tiere nach FELASA-Empfehlungen (Federation of European Laboratory Animal Association) kontrolliert.

1.2. Tierstämme

Folgende Mauslinien wurden für die Anfertigung dieser Arbeit genutzt:

- C57BL/6J
- CX₃CR1GFP
- Clec9a-Cre;Rosa26-tomato;CX₃CR1GFP

1.2.1. C57BL/6J

C57BL/6J (The Jackson Laboratory, Bar Harbor) ist der am weitesten verbreitete Inzuchtstamm. Er ist der erste Mausstamm, bei dem das Genom vollständig sequenziert wurde. Daher eignet er sich hervorragend als genetischer Hintergrund anderer transgener Linien

Für die vorliegende Arbeit wurde dieser Wildtyp-Stamm in der Erstellung von Knochenmarkchimären sowohl als Donor als auch Empfänger verwendet.

1.2.2. CX₃CR1GFP

Bei diesem transgenen Maustamm wird das Fluoreszenzprotein GFP (Green Fluorescent Protein) unter Kontrolle des endogenen CX₃CR1 Lokus exprimiert [112]. Dadurch können CX₃CR1⁺-Zellen in der Intravitalmikroskopie und Immunhistochemie identifiziert werden.

Die Tiere sind auf einen C57BL/6J-Hintergrund gezüchtet und kamen sowohl in *in vivo*-Versuchen als auch in *ex vivo*-Untersuchungen zum Einsatz.

1.2.3. Clec9a-Cre;Rosa26-tomato;CX₃CR1GFP

Im Mausmodell Clec9a-Cre;Rosa26-tomato;CX₃CR1GFP steht die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Promotors Clec9a. Verbunden mit dem Reporterprotein Rosa-26-tomato werden Clec9a-Zellpopulationen durch die Expression des roten Fluoreszenzfarbstoffes nach Aktivierung der Cre-Rekombinase sichtbar gemacht. In Kombination mit CX₃CR1GFP-Tieren entstand ein Mausmodell, das sich hervorragend zur *in vivo*-Analyse der Interaktionen von Makrophagen und DCs unter Bedingungen der sterilen Inflammation in der Mikrozirkulation des murinen Ohrgewebes eignet.

Genetische Verfolgungen des DNGR-1-Gens (Clec9a) haben gezeigt, dass es spezifisch die Zellen markiert, die traditionell der DC-Linie zugeschrieben werden. In einigen Geweben werden somit auch Monozyten und Makrophagen als Abkömmlinge von DC-Vorläuferzellen detektierbar [215].

Tiere dieser Linie fanden Anwendung in *in vivo*-Untersuchungen mit dem 2-Photonen-Mikroskop.

2. *In vivo*-Untersuchungen

2.1. Anästhesie

Da die *in vivo*-Untersuchungen in dieser Arbeit zwar minimal-invasiv, aber durch die Fixationstechnik trotzdem schmerzhaft sind und das Tier intravitalmikroskopisch bis zu sieben Stunden untersucht werden soll, wurde eine Allgemeinnarkose angewandt. Die Narkose ist ein, durch Anästhetika hervorgerufener, reversibler Zustand und zeichnet sich durch Hypnose, Relaxation, Analgesie und Dämpfung der Reflexe aus.

Für die Allgemeinnarkose wurden mindestens zwei Präparate aus den Gruppen Sedativa, Hypnotika und Analgetika in einer Kombinationsnarkose verwendet. Durch ein solches Vorgehen können Nebenwirkungen wie Atem- und Kreislaufdepression erheblich gemindert werden. Außerdem kann durch gegenseitiges Ergänzen und Potenzieren der Wirkeigenschaften die Dosierung der einzelnen Anästhetika deutlich reduziert werden. Die hier verwendete Kombinationsnarkose bestand aus einer Narkoseeinleitung mit Isofluran und einer anschließenden Injektionsnarkose, die intraperitoneal verabreicht wurde.

Isofluran liegt bei Raumtemperatur als Flüssigkeit vor und muss durch spezielle Verdampfer (Vaporen) in den dampfförmigen Zustand überführt werden. Das Einatmen bewirkt, durch raschen Wirkungseintritt eine gute Hypnose und Muskelrelaxation, aber keine Analgesie.

Zunächst wurde die Maus in eine Röhre aus Plexiglas verbracht und diese mit einem Gemisch aus 5.0 Vol % Isofluran (Isofluran CP, cp-pharma, Burgdorf) und bei einer inspiratorischen Sauerstofffraktion von 0.35 l/l über einen Verdampfer (Ohmeda Isotec 3, Fa. Eickmeyer, Tuttlingen) geflutet. So konnte gewährleistet werden, dass das Tier keinen unnötigen Stress leidet. Sobald die Stellreflexe erloschen waren, wurde dem Tier nach Entnahme der Röhre sofort die vollständig antagonisierbare Kombinationsnarkose intraperitoneal (i.p.) mit einer Kanüle (30G, BD Mikrolance, Becton Dickson and Company, Franklin Lakes, USA) injiziert. Die Narkose wurde durch die i.p.-Injektion von Fentanyl (Fentadon, Albrecht GmbH Aulendorf), Midazolam (Midazolam-hameln, Hameln Pharmaceuticals GmbH, Hameln) und Medetomidin (Dorbene, Pfizer GmbH, Berlin) erreicht.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Narkose

Wirkstoff	Stoffgruppe	Wirkungsort	Konzentration	Antagonist
Fentanyl	Opioide	μ -Opioidrezeptor	0,05 mg/kg KG	Naloxon
Medetomidin	α 2-Agonist	α 2-Adrenorezeptoren	5,0 mg/kg KG	Atipamezol
Midazolam	Benzodiazepine	GABA _A -Rezeptoren	0,5 mg/kg KG	Flumazenil

Bis zum Eintritt der Wirkung wurde das Tier in einer lichtgeschützten Box an einen ruhigen Ort verbracht und nach etwa zehn Minuten wurde die Narkosetiefe durch den fehlenden Zwischenzehenreflex sowie das Fehlen von Schmerzreflexen, bei Stimulation am äußeren Gehörgang geprüft. Zum Schutz vor Hornhautaustrocknung wurde eine Augensalbe (Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Bayer, Leverkusen) auf die Cornea aufgebracht.

Während der bis zu sieben Stunden andauernden intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurde die Narkose alle 35 bis 40 min durch den Zwischenzehenreflex überprüft und gegebenenfalls angepasst.

2.2. Applikationstechniken

Die Injektionsmöglichkeiten der verschiedenen Modelle dieser Arbeit, wie zum Beispiel die Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen, Antikörpern und weiteren Substanzen, sollen im Folgenden näher erläutert werden.

2.2.1. Injektion durch Schwanzvenenkatheter

Die Injektion durch den Schwanzvenenkatheter stellt eine Möglichkeit dar, Substanzen intravenös zu verabreichen. Der Katheter eignet sich sowohl als Venen-Verweil-Katheter in intravitalmikroskopischen Modellen am narkotisierten Tier, als auch für einmalige Injektionen bei der Knochenmark-Transplantation am wachen Tier. Die beiden lateral verlaufenden Schwanzvenen (*Venae coccygeae laterales*) eignen sich hervorragend für die Platzierung des Katheters.

Der dazu benötigte Katheter wurde aus zwei Kanülen (30G, BD Mikrolance, Becton Dickson and Company, Franklin Lakes, USA) und einem Polyethylenschlauch (Fine Bore Polythene Tubing, 0,28 mm ID 0,61 mm OD Smiths Medical International, Hythe, USA) hergestellt. Zuerst wurde der Polyethylenschlauch auf etwa 8 cm zugeschnitten und eine der beiden Kanülen in ein Ende des Schlauches eingeführt. Von der anderen Kanüle wurde der Konus entfernt und in das andere Schlauchende eingefädelt. Im nächsten Schritt wurde eine 1 ml-Spritze (1 ml Injekt-F, B.Braun, Melsungen) mit 0,9 %-NaCl-Lösung (NaCl 0,9 %, B.Braun, Melsungen) befüllt, auf den Konus aufgesteckt und der Katheter durch die Spülung auf Durchgängigkeit geprüft. Luftblasen in Schlauch und Konus sollten dabei vermieden werden.

Das narkotisierte Tier, das bis dahin auf der Wärmematte platziert war, wurde in Seitenlage positioniert und die laterale Schwanzvene durch Druck mit Zeige- und Mittelfinger an der Schwanzbasis gestaut. Die Stelle wurde desinfiziert (Octenisept, Schülke GmbH, Norderstedt), mithilfe eines Nadelhalters wurde vorsichtig die Katheternadel in die Vene eingeführt und mit Gewebekleber (Histoacryl, B. Braun Surgical, S.A., Rubi, Spanien) am Schwanzgewebe fixiert.

2.2.2. Intraperitoneale Injektion

Für die i.p.-Injektion wurde das Tier bis zum Verlust der Reflexe mit einem Isofluran-Sauerstoffgemisch (5.0 Vol. % Isofluran, FiO₂ von 0.35 l/l, Isofluran CP, cp-pharma, Burgdorf) narkotisiert und kopfüber an Schwanz und einem Hinterbein mit einer Hand fixiert.

Mit der anderen Hand wurde mit einer auf eine 1 ml Spritze (1 ml Injekt-F, B.Braun, Melsungen) aufgesetzten Kanüle (30 G, BD Mikrolance, Becton Dickson and Company, Franklin Lakes, USA) im unteren linken Quadranten eingestochen und durch Aspiration ausgeschlossen, dass ein Gefäß oder die Höhle eines Organs verletzt wurde. Dann wurde die Substanz appliziert und das Tier im Anschluss, bis zum vollständigen Wiedererlangen des Bewusstseins, auf einer Wärmematte platziert und beobachtet.

2.2.3. Subkutane Injektion

Die subkutane (s.c.) Injektion der Substanzen HMGB1 und BoxA wurde am Ohr des narkotisierten, auf dem Rücken liegenden Tieres vorgenommen: Dazu wurde eine Insulinspritze (BD Micro-Fine, 100U, Beckton Dickinson und Company, Franklin Lakes, USA) befüllt und deren Nadel durch leichten Druck auf eine feste Oberfläche gebogen, um den Einstechwinkel so gering wie möglich zu halten. Vorsichtig wurde nun die Nadel durch die Epidermis in die Dermis vorgeschoben und die Substanz unter Kontrolle einer Stereolupe an mehreren Stellen appliziert.

2.3. Erstellung von Knochenmarkchimären

Für die intravitalmikroskopische Analyse der Herkunft gewebständiger CX₃CR1⁺- Zellen mussten Knochenmarkchimären erstellt werden. Dafür wurden im ersten Versuch C57BL/6J-Tiere bestrahlt und Knochenmark von CX₃CR1GFP- Spendertieren isoliert. Das aufbereitete Knochenmark wurde in die Empfängertiere über die Schwanzvene injiziert. Im zweiten Versuch wurde Knochenmark von CX₃CR1GFP-Tieren in bestrahlte Tiere der C57BL/6J-Linie injiziert.

2.3.1. Definition Chimäre

Eine Chimäre bezeichnet einen einzelnen Organismus, der aus genetisch unterschiedlichen Zellpopulationen besteht. Durch Bestrahlung werden schnell proliferierende Zellen, wie hämatopoetischen Stammzellen, abgetötet und die Tiere immunsupprimiert. Dies führt nach einer Injektion mit lebenden isolierten Knochenmarkszellen eines genetisch unterschiedlichen Spendertieres, zum Bestehen beider Immunzellkomponenten in einem Organismus. Das Empfängertier hat nun neben seiner eigenen Charakteristik des Immunsystems auch genetische Eigenschaften des Spenderorganismus.

2.3.2. Zellaufbereitung für die Transplantation

Zunächst wurden die narkotisierten Knochenmark-Spendertiere (5.0 Vol. % Isofluran, FiO₂ von 0.35 l/l, Isofluran CP, cp-pharma, Burgdorf) durch zervikale Dislokation getötet. Danach wurde am toten Tier beidseitig Humerus, Femur sowie die Tibia abgesetzt und von Haut, Muskeln und Sehnen befreit. Die Knochen wurden bei 4 °C in Petrischalen (Falcon, Corning Science, Mexiko) in sterilem PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) auf Eis aufbewahrt und unter einer sterilen Sicherheitswerkbank weiterverarbeitet. Im nächsten Schritt wurden beide Seiten des Knochens abgetrennt, um die Knochenmarkhöhle zu eröffnen. Ein Zellsieb mit einer Porengröße von 70 µm (Falcon, Corning Incorporated, Durham, USA) wurde mit PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) benetzt und das Knochenmark aus den geöffneten Knochen mit 4 °C kaltem PBS und 2 % FBS (FBS Superior, Biochrom GmbH, Berlin) mit einer 26 G-Kanüle (BD Mikrolance, Becton Dickson GmbH, Franklin Lakes, USA) und einer 10 ml-Spritze (BD Discardit II Becton Dickson GmbH, Franklin Lakes, USA) durch den Filter in einen 50 ml-Falcon (Falcon, Corning Science, Tamaulipas, Mexiko) gespült. Zu dem Gemisch im Falcon wurden weitere 25 ml PBS und 2 % FBS mit Hilfe des Filters hinzugefügt. Im weiteren Ablauf wurde das gewonnene Knochenmark bei 4 °C 300 G für 7 min abzentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5810R), der Überstand abgegossen und nach Hinzufügen von 5 ml Ammoniumchloridlysepuffer (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 1 mM EDTA, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) für 10 min das Zellgemisch bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte, um die Reaktion der Erythrozyten-Lyse zu stoppen, die Zugabe von 30 ml PBS und 2 mM EDTA und das Gemisch wurde erneut mit einem Zellsieb mit einer Porengröße von 70 µm abfiltriert. Nach weiterem Zentrifugieren bei 4 °C und 300 G für 5 min wurde der Überstand verworfen und die Knochenmarkszellen mit PBS resuspendiert. Die Zellanzahl wurde in der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop bestimmt. Dazu wurde 1 µl des Zellgemisches zu 99 µl phosphatgepufferter Salzlösung mit 0,5% BSA (Albumin Fraktion V, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) hinzugegeben. Mithilfe der Neubauer-Zählkammer und der Formel ($\text{Gesamtzahl der 64 kleinen Quadrate} / 4 * 100 * 2 * 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$) wurden 10 µl der Suspension nach Hinzugabe von 10 µl Trypanblau (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) ausgezählt.

Eine Zellzahl von mindestens 10×10^6 Zellen pro Empfänger wurde in 1 ml-Spritzen (1 ml Injekt-F, B. Braun, Melsungen) auf die Anzahl der Empfängertiere aufgeteilt und die Spritzen bis zum Zeitpunkt der Transplantation bei 4 °C aufbewahrt.

2.3.3. Bestrahlung der Empfängertiere

Für die Bestrahlung wurden die Tiere in ein speziell dafür angefertigtes Bestrahlungsrondell aus Plexiglas verbracht. Jedes Tier hatte dort ein eigenes abgetrenntes Abteil; bis zu sechs Tiere können damit gleichzeitig bestrahlt werden. Nach zweimaliger Ganzkörperbestrahlung bei 6 Gy und 10 mA für 3 min und 44 sec im Abstand von vier Stunden waren die Tiere ausreichend immunsupprimiert [233].

2.3.4. Applikation der Knochenmarkzellen

Direkt nach der letzten Bestrahlung wurde den Tieren mit Hilfe eines Schwanzvenenkatheters eine Dosis von ca. 10 Mio. Zellen injiziert.

Für dieses Vorhaben wurde das Tier nach der letzten Bestrahlung in einen Restrainer (Tailveiner Restrainer for Mice, TV-150 STD, Braintree Scientific, USA) verbracht und fixiert. Der freiliegende Schwanz wurde nun wieder mit dem Zeige- und Mittelfinger der einen Hand an der Schwanzbasis gestaut und nach Desinfektion der Injektionsstelle (Octenisept, Schülke GmbH, Norderstedt) mit der anderen Hand der Katheter unter Zuhilfenahme eines Nadelhalters in die Vene eingebracht. Nach Applikation der Zellen wurde der Katheter entfernt und auf die Injektionsstelle für einige Zeit mit einem Tuch (Wypall, Kimberly-Clark, Koblenz) Druck ausgeübt, um Nachblutungen zu vermeiden.

Nach der Transplantation wurden den Tieren für vier Wochen saures, autoklaviertes Leitungswasser (pH 3.1) mit Cotrimoxazol (Cotrim-ratiopharm, Ampullen SF 480 mg/5 ml, Ratiopharm, Ulm, 480 mg Cotrimoxazol pro ein Liter angesäuertes Wasser) verabreicht, um Infektionen vorzubeugen. Nach einer Wartezeit von insgesamt acht Wochen wurden sie anschließend intravitalmikroskopisch untersucht.

2.4. Intravitale 2-Photonen-Mikroskopie

Durch die natürliche Beschaffenheit des Gewebes und die daraus resultierende Streustrahlung ist es schwierig, in tieferen Geweben mit herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopen oder der konfokalen Mikroskopie hochauflösende Bilder und intravitalmikroskopische Videos mit mehr als 100 μm Tiefe zu erstellen [234]. In der Vergangenheit wurden immunhistochemische Färbungen und FACS-Analysen genutzt, um Strukturen und Rezeptoren von tiefer liegenden Geweben sichtbar zu machen - der Einblick in das *in vivo*-Verhalten in Aufnahmen der dritten Dimension von Zellen unter Ruhebedingung oder in verschiedenen Krankheitsmodellen blieb den Forschern so verwehrt [235]. Das Konzept der 2-Photonen-Absorption wurde erstmals 1931 in der Dissertation von Maria Göppert-Mayer beschrieben und durch den Münchner Physiker Winfried Denk im Jahre 1990 zum 2-Photonen-Mikroskop entwickelt und ausgereift [236, 237]. So gelang die *in vivo*-Bildgebung über längere Zeit auch in tiefen Geweben.

Die Grundvoraussetzung der *in vivo*-Bildgebung ist die Markierung der zu untersuchenden Strukturen mit Fluorochromen. Eine einfache Applikationstechnik, um die Mikrovaskulatur im Ohrgewebe sichtbar zu machen, ist die intravenöse Gabe von Evans Blue, Dextranen, Lektinen oder den Quantum Dots [235]. Es haben sich zahlreiche monoklonale Antikörper etabliert, um Immunzellpopulationen spezifisch zu markieren und deren Verhalten *in vivo* zu studieren.

2.4.1. Grundlagen der 2-Photonen-Mikroskopie

Bei herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie-Techniken absorbiert ein Fluorochrom ein Photon, das zuvor durch eine bestimmte Wellenlänge und Menge an Energie stimuliert wurde und danach wieder unter Abgabe von fluoreszierendem Licht das Energielevel verlässt. Dabei ist die Fluoreszenzintensität linear zur Energie, mit dem das Photon angeregt wurde. Eine Verdopplung der Lichtintensität bewirkt eine Vervierfachung der Fluoreszenz [238, 239]. Zwei oder mehr langwellige Photonen können gleichzeitig das Fluorochrom zum Aussenden von Fluoreszenzlicht anregen. Voraussetzung ist, dass die beiden Photonen ausreichend Energie speichern, um ein Elektron in den Anregungszustand zu versetzen. In beiden Fällen wird durch die Absorption der Photonen ein Anregungszustand generiert, bei dem das Molekül im Relaxationszustand ein fluoreszierendes Photon abgibt. Unter Absorption von einem oder zwei (bzw. mehreren) Photonen führt dies zu verschiedenen Absorptionsspektren [239].

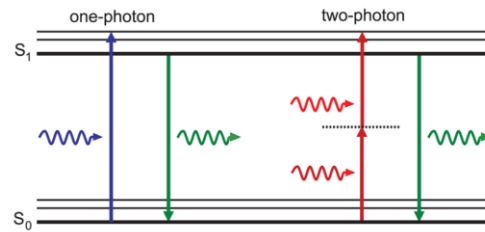


Abbildung 19: Das Jabłoński-Diagramm zeigt die Fluoreszenzanregung durch Photonen

In beiden Fällen wird durch die Absorption der Photonen ein Anregungszustand generiert, bei dem das Molekül im Relaxationszustand ein fluoreszierendes Photon abgibt. Unter Absorption von einem (links) oder zwei Photonen (rechts) führt dies zu verschiedenen Absorptionsspektren.

Mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons, Inc. [240], Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Inc.

Um die Menge an Energie zu generieren, wird ein gepulster Infrarotlaser eingesetzt, der kurze Lichtpulse im Femtosekunden-Bereich erzeugt und diese Phasen miteinander koppelt (Modenkopplung). Daraus resultiert, dass sich die Exzitation des Lasers nur auf ein kleines Volumen konzentriert und die Photonendichte dort am höchsten ist. Die Photonendichte reicht ober- und unterhalb dieses ellipsoiden Volumens nicht aus, um die Fluoreszenz anderen Gewebes anzuregen [241]. In Abb. 20 ist der Aufbau und Strahlengang eines 2-Photonen-Mikroskops schematisch dargestellt. Durch die fehlende Lochblende wird das Fluoreszenzlicht an der Bildebene gesammelt und detektiert; über und unter der Bildebene entsteht keine Fluoreszenz [240].

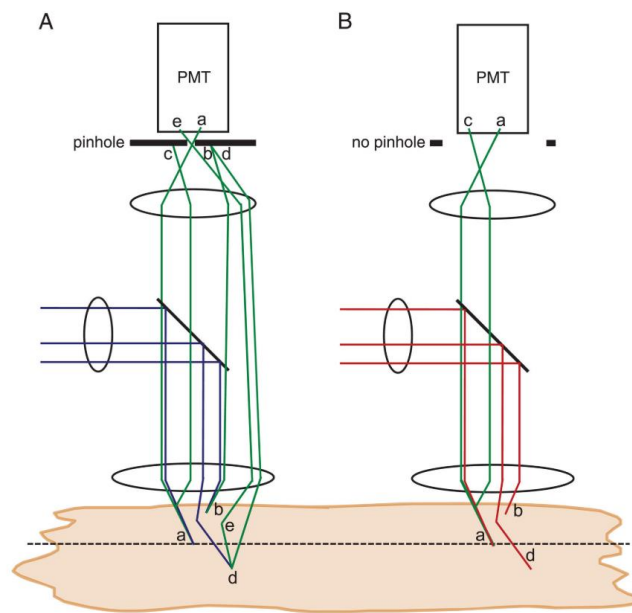


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Unterschiede in der Streuung von konfokalem Mikroskop und 2-Photonen-Mikroskop

A Aufbau und Strahlengang des konfokalen Mikroskops: Fluoreszenzlicht wird auf das Objektiv fokussiert (a) und wird durch die zwischengeschaltete Lochblende fokussiert (b). Streulicht wird bei der Reflektion durch das Pinhole nicht detektiert (c). Ein Teil der Streustrahlung erreicht nie den Fokus (d). Hintergrundrauschen wird durch einen kleinen Teil der Streustrahlung verursacht, die durch die Blende fällt (e) **B**: Aufbau und Strahlengang im 2-Photonen-Mikroskop: Ohne Lochblende wird das Fluoreszenzlicht an der Bildebene gesammelt und detektiert (a). Über und unter der Bildebene entsteht keine Fluoreszenz (b). Licht, das auf die Bildebene fällt, wird so gestreut, aber aufgrund fehlender konfokaler Lochblende, gesammelt; die angeregte Streustrahlung generiert auch keine unfokussierte Fluoreszenz (d). Nimmt die Streustrahlung zu, so verringert sich das Signal und das Hintergrundrauschen wird nicht verstärkt.

Mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons, Inc. [240], Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Inc.

Um dreidimensionale (3D) Bilder zu erzeugen, wird nun die Fokusebene durch das Gewebe in z-Stacks von oben nach unten gescannt und damit generelles Fotobleichen in Langzeit-Videoaufnahmen vermieden. [241] Weitere Vorteile ergeben sich durch die Verwendung von Infrarotlasern, die eine hohe Eindringtiefe von bis zu 1000 μm zulassen. Auch wird die Detektionseffizienz gesteigert, sodass die Detektoren nahe an der Optik angebracht werden können. Zuletzt gewährleistet das 2-Photonen-Mikroskop eine gute Trennung von Anregungs- und Emissionswellenlängen. Nachteile ergeben sich durch die spezielle gepulsten Lasersysteme, die nötig sind, um adäquate Exzitationsraten zu generieren. Darüber hinaus sind diese Laser der Klasse IV gefährlich für Auge und Haut durch diffuse Reflektion der Strahlung.

Voraussetzungen, die ein 2-Photonen-Mikroskop für das murine Ohrmodell mitbringen sollte, sind eine aufrechte Objektposition; invertierte 2-Photonen-Mikroskope (wie die von konventionellen konfokalen Mikroskopen) sind für das Ohrmodell ungeeignet. Des Weiteren sollte die Plattform, auf der die Stage mit der präparierten Maus zum Liegen kommt, höhenverstellbar und automatisch zu bedienen sein. Um dem Gewebedrift (Absinken des Gewebes) entgegenzusteuern, empfiehlt sich eine Drift Correction-Software [242], die auch in der Anfertigung dieser Arbeit genutzt wurde. Außerdem müssen die Filterhalter leicht zugänglich sein, damit die Filter unkompliziert ausgetauscht und an neue Settings angepasst werden können.

2.4.2. Aufbau des 2-Photonen-Mikroskops

Das 2-Photonen-Mikroskop (LaVision Biotech, Bielefeld, Deutschland), welches zur Anfertigung dieser Arbeit herangezogen wurde, stellt ein zusammengesetztes System aus verschiedenen Bestandteilen dar, die in der Abb. 21 zu sehen sind: Die Laserquelle ist ein Titanium:Sapphire Oszillator (Ti:Sa, MaiTai, Spectra Physics, Darmstadt, Deutschland), dessen Anregungsspektrum die Wellenlängen 680 bis 1040 nm umfasst. Dadurch ist die 2-Photonen-Mikroskopie auf blaue, grüne und gelbe fluoreszierende Proteine limitiert [243]. Kombiniert mit einem optisch-parametrischen Oszillator (OPO), kann das Spektrum im Infrarotbereich um den Wellenlängenbereich 1100 bis 1600 nm vergrößert werden und schafft so die Möglichkeit einer synchronen Anregung und Detektion von Fluorophoren mit großem Unterschied im Spektrum wie zum Beispiel Farben im Infrarot-Bereich. Der OPO konvertiert kurze Ti:Sa Laserstrahlen in regelbare Strahlen im längeren Wellenbereich.

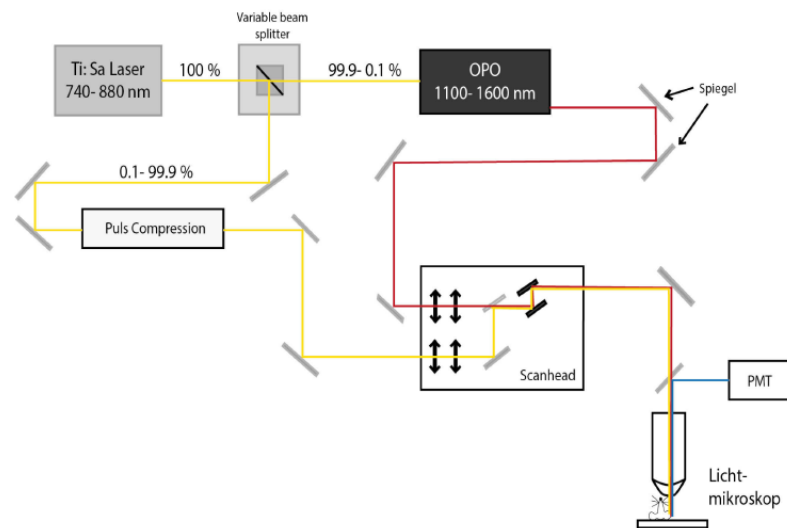


Abbildung 21: Strahlengang und Komponenten des 2-Photonen-Mikroskops

Der Strahlengang des Lasers führt zunächst durch die Beam-Splitter Box, die die Strahlung für den OPO zugänglich macht. Am Computer kann manuell die Aufteilung der Strahlung zu OPO (rote Linie) und Ti:Sa (gelbe Linie) geregelt werden. Das Licht wird weiter über die Pulskompression zum Scanhead (Ebenen-Scan) geleitet und trifft schließlich auf das präparierte Gewebe. Der PMT (Photomultiplier tube, Photonenvervielfacher) detektiert das reflektierende Licht. Ein Computer übernimmt die Verarbeitung dieses Signals.

Modifiziert nach LaVisionBioTec GmbH (mit freundlicher Genehmigung von Dr.med.vet Meike Miller)

Durch das sich anschließende Lichtmikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland), das aus einem Wasserimmersions-Objektiv (16-fache Vergrößerung) mit einer Numerischen Apertur ($NA = 0,95$) zusammengesetzt ist, ergeben sich Aufnahmen mit hohem Kontrast und hoher Auflösung.

2.4.3. Bildauswertung

Die Aufnahmen, die für diese Arbeit herangezogen wurden, wurden mit einer Wellenlänge zwischen 800 bis 900 nm und mit einem Bildausschnitt von $588 \mu\text{m} \times 588 \mu\text{m}$ angefertigt. Die Auflösung betrug 512×512 Pixel pro Bild. Mit der ImSpector-Software (LaVision, Bielefeld) wurde weiterhin eine Frequenz von 400 Hz und eine Tiefenscanebene (z-Stacks) von 10 bis $50 \mu\text{m}$ festgelegt. Die Bilder in einem z-Stack betragen den Abstand von $3 \mu\text{m}$; wenn die Drift-Correction-Software zum Einsatz kam, betragen sie 0,6 bis $1,2 \mu\text{m}$. Mit dem Auswerteprogramm Imaris (Bitplane AG, Zürich, Schweiz) wurden diese Bilderstapel zu einem 3D-Bild verrechnet. Zusätzlich, um das Gewebe vor zu starker Laserstrahlung und die Fluorochrome vor Verblässung zu bewahren, wurde eine Wartezeit von 30 sec zwischen den einzelnen z-Stacks eingeführt.

Ebenfalls wurde mit der Software Imaris die Analyse der migrierenden Zellen durch das Tracking-Verfahren vorgenommen: Der Weg jeder einzelnen Zelle wurde durch mindestens 25 Einzelzeitpunkten über die Zeit verfolgt und die Parameter Geschwindigkeit, Versetzungsrate im Gewebe und Geradlinigkeit untersucht. Ebenfalls konnte die Bildung von Dendriten, die Zellzahl und Interaktionen von verschiedenen Zellen mit Imaris bestimmt werden.

2.5. Die sterile Entzündung im Ohrmodell

In dieser Arbeit wurden Aufnahmen der Mikrozirkulation des Ohrs mittels 2-Photonen-Mikroskopie *in vivo* angefertigt.

Die Orientierung im Ohrmodell wird durch anatomische Strukturen erleichtert: im Multiphotonenmikroskop geben dermale Bindegewebsfasern ein SHG (Second Harmonic Generation) – Fluoreszenzsignal ab, das bei einer Wellenlänge 840 nm im blauen Kanal sichtbar wird. Die zwischen dorsaler und ventraler Ohrfläche liegende Knorpelschicht fluoresziert ebenfalls, wie in Abb. 22 sichtbar. Im Gegensatz zur Dermis ist die Epidermis kollagen- und knorpelfrei und beide Gewebsanteile können so voneinander unterschieden werden [217].

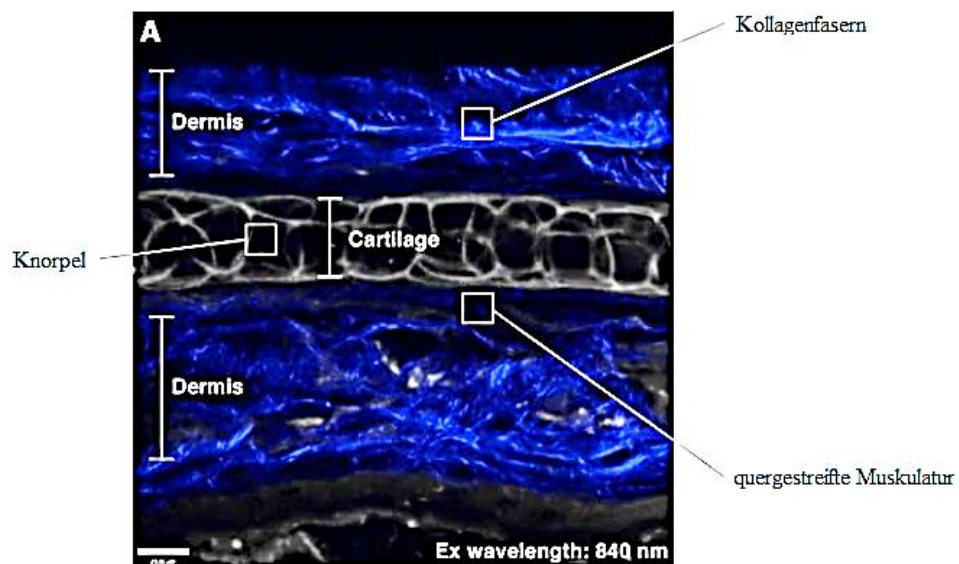


Abbildung 22: Durch das 2-Photonen-Mikroskop visualisierter Querschnitt durch das murine Ohrgewebe

Querschnitt durch das Ohrgewebe mit dem 2-Photonen-Mikroskop. Neben Kollagenfasern (sichtbar durch das SHG) sind auch Knorpelstrukturen und quergestreifte Muskulatur gut zu erkennen und voneinander abzugrenzen. Modifiziert nach Roediger et al. 2008.

Mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature [217], Copyright © Springer-Verlag 2008

Da Haare und Haarfollikel ebenfalls Autofluoreszenzsignale abgeben, muss eine möglichst haarlose Stelle im Ohrmodell für die *in vivo*-Mikroskopie verwendet werden.

Um weitere Strukturen in der Dermis darzustellen, eignet sich die Applikation von Gefäßfarbstoffen und Antikörpern durch intravenöse Injektionen über einen Schwanzvenenkatheter. Durch die mit endogenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Zellen der verschiedenen Mauslinien lassen sich die Interaktionen von zahlreichen Zellpopulationen intravitalmikroskopisch erfassen.

2.5.1. Präparation des Ohrmodells

Zunächst wurde die Maus in Narkose versetzt, Augensalbe (Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Bayer, Leverkusen) aufgetragen und bei Erlöschen des Zwischenzehenreflexes ein Schwanzvenenkatheter gelegt. Auf dem Rücken liegend wurde die Maus nun mit dem Ohr auf der Stage positioniert und die Hinterläufe sowie die gegenüberliegende Vordergliedmaße des Ohres, das mikroskopiert werden soll, auf der Stage mit Klebeband (Transpore 3 M, Health Care, Neuss) fixiert. Das Ohr wurde im nächsten Schritt mit gebogenen Nadelspitzen einer 30 G Kanüle auf den Gummiring der Stage gepinnt. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Ohr gleichmäßig gespannt war und es zu keiner Faltenbildung kam. In einem weiteren Schritt wurde der Spalt zwischen Nadeln, Stage und Ohr mit Silikon abgedichtet und die präparierte Maus in den Wärmeinkubator des 2-Photonen-Mikroskops gelegt. Zuletzt wurde ein ausreichend großer Tropfen destilliertes, 37 °C warmes Wasser auf das Ohr aufgetragen und dies unter dem Objektiv positioniert.

2.5.2. Laserverletzung im 2-Photonen-Mikroskop

Zuerst wurde im Ohrgewebe eine plane, geeignete Stelle ausfindig gemacht, die sich in der Nähe von postkapillären Venolen mit gutem Blutfluss befand. Um die Bedingungen einer sterilen Entzündung nachzustellen, wurde der Laser des 2-Photonen-Mikroskops auf ein kleines Areal (ROI, region of interest) im Gewebe von 42 µm x 42 µm für eine Minute bei 20 bis 22 % der Laserpower und einer Wellenlänge von 800 nm fokussiert. Eine erfolgreiche Verletzung des Gewebes zeigte eine starke Autofluoreszenz und grenzte sich somit vom gesunden Gewebe ab.

War dies nicht erfolgreich und es konnte keine ausreichend große autofluoreszierende Stelle entstehen, wurde entweder die Laserpower erhöht und der Vorgang wiederholt oder eine andere, ebenere Stelle eingestellt und dort eine neue Verletzung gesetzt.

2.5.3. Darstellung der Strukturen *in vivo*

Neben dem SHG-Signal, das im blauen Kanal zu sehen war, und den gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen bzw. Monozyten (beide im grünen Kanal sichtbar), kamen für die Darstellung der Gefäße folgende Fluoreszenzfarbstoffe zum Einsatz (siehe Tabelle 3):

Tabelle 3: Fluoreszenzfarbstoffe zur Darstellung der Gefäße

	TRITC	FITC	AngioSense®750	Qtracker®705
Konzentration	2 MDa	2 MDa	2 µM	2 µM
Anregung	555 (580)* nm	495 (519)* nm	750 (779)* nm	405-665 (705)* nm
Name des Herstellers	Life Technologie, Thermofisher	Sigma-Aldrich	PerkinElmer	Invitrogen, Thermofisher

* in Klammer Emission

Die Sichtbarkeit der neutrophilen Granulozyten wurde durch eine Injektion von anti-Ly6GPE (PE Rat Anti-mouse, Ly-6G, Klon 1A8, BD Pharmingen, Heidelberg) in einer Konzentration von 15 µg/mL erreicht. Wurde das Gewebe mit Licht der Wellenlänge 496 nm angeregt, so waren die Neutrophilen im roten Kanal sichtbar (maximale Emission von 578 nm).

Da die oben genannten verabreichten Fluoreszenzfarbstoffe nach einiger Zeit verblassten, musste alle zwei bis drei Stunden die entsprechende Dosis (siehe Tabelle 3) über den zuvor gelegten Schwanzvenenkatheter verabreicht werden.

2.5.4. Depletion der neutrophilen Granulozyten

Die Depletion von Zellen beschreibt die Entfernung einer spezifischen Zellart aus einem Zellgemisch. Durch die Injektion zellspezifischer Antikörper werden die Zielzellen aus dem Organismus entfernt.

Um die Auswirkungen der neutrophilen Granulozyten auf die gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen zu eruieren, wurde der spezifische Antikörper gegen das Protein Ly6G (purified rat anti-mouse Ly6-G, Klon 1A8, BD Pharmingen, Heidelberg) injiziert.

Das Ly6G-Protein wird explizit nur auf reifen Granulozyten exprimiert und schließt somit Subpopulationen von Monozyten, Lymphozyten und dendritischen Zellen aus [244].

Im Verlauf des Versuches wurde der Antikörper zwölf Stunden vor der intravitalmikroskopischen Untersuchung am 2-Photonen-Mikroskop in einer Konzentration von 50 µg/ml intravenös durch einen Schwanzvenenkatheter injiziert. Die Kontrollgruppe wurde im gleichen Zeitabstand mit der identischen Konzentration des korrespondierenden Isotypantikörpers (rat IgG2b kappa Isotyp, 1 mg/mL, eBioscience, Frankfurt) behandelt. Durch eine intrakardiale Entnahme des Blutes nach der Beendigung des Versuches wurden die Blutproben durch das Blutanalysegerät (ABX Micros Axonlab, Reichenbach/Stuttgart) auf die Indikation einer Neutropenie untersucht.

2.5.5. Injektion von BoxA und HMGB1

Das in den extrazellulären Raum bei einer Entzündung freigesetzte HMGB1 beeinflusst die Zellrekrutierung und das Verhalten von Immunzellen im Gewebe. Durch die Blockierung dieses DAMPs durch den inhibitorischen Faktor BoxA (BoxA from HMGB1 human & mouse, HMGBiotech, Mailand, Italien) wurden die Effekte auf das Muster der Zellrekrutierung untersucht. 30 min vor der intravitalmikroskopischen Untersuchung wurde das BoxA in einer Konzentration von 83 µg s.c. an verschiedenen Stellen in das Ohrgewebe injiziert. Danach wurde, wie zuvor beschrieben, eine Laserverletzung gesetzt und Videomaterial über einen Zeitraum von 270 min angefertigt. Ebenso wurde mit der Isotyp-Kontrolle (BoxA 2D, negative control of BoxA wt, HMGBiotech, Mailand, Italien) verfahren.

Nach der gleichen Methode wurden auch mutHMGB1 (Non-oxidizable chemokine-HMGB1, LBS free, HMGBiotech, Mailand, Italien) und dsHMGB1 (Disulfide HMGB1, HMGBiotech, Mailand, Italien) in das Ohrgewebe in einer Konzentration von 10 µg/mL s.c. eingegeben und eine Kontrollgruppe mit PBS (Phosphate Buffered Saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung) in der gleichen Weise behandelt.

3. *Ex vivo*-Untersuchungen

Da es im Zuge dieser Arbeit in den *in vivo*-Versuchen bisher nicht gelungen ist, die zu charakterisierenden Zellen, nach intravenöser und subkutaner Gabe von monoklonalen Antikörpern, zu markieren und auszuwerten, wurde eine Methode entwickelt, wie *ex vivo* die entsprechenden Strukturen histologisch angefärbt werden können.

3.1. Dermal Sheet-Präparation

Die Anfertigung von histologischen Gewebsschnitten stellt nach immunhistologischer Färbung nur eine hauchdünne Schicht zur Analyse von Strukturzusammenhängen dar, die auf wenige μm beschränkt ist. Dagegen erlauben Epidermal und Dermal Sheets einen Einblick in die Komplexität des bis zu mehreren cm^2 dicken Gewebstücks und ermöglichen z.B. die Darstellung von Zellen im Kontext zu anderen Komponenten des sie umgebenden Gewebes. [245] Epidermal und Dermal Sheets werden in der Forschung genutzt, um beispielsweise das Immunnetzwerk der Haut zu studieren. [246] Sie finden außerdem Anwendung in der Dermatologie und liefern neue Erkenntnisse in regenerativer Therapie [247] und Wundheilung [248].

Da in der vorliegenden Arbeit dermale Prozesse der Haut beschrieben werden, musste zuvor die Epidermis entfernt werden, da diese bei Säugern durch das *Stratum corneum* und die Tight Junctions über zwei physische Schutzbarrieren verfügt. Diese verhindern, dass interne Komponenten des Körpers nach außen gelangen und halten externe Antigene davon ab, in die Haut einzudringen [249]. So ist es den immunhistochemischen Antikörpern ohne vorheriges Entfernen der Epidermis nicht möglich, Strukturen in der Dermis anzufärben.

3.1.1. Vorbereitung der Gewebeprobe

Nach der Induktion von mindestens sechs Laserverletzungen in jedes Ohr der Maus wurde das Tier weiterhin unter Narkose gehalten und so die sterile Entzündung über vier Stunden inkubiert. Im nächsten Schritt wurde das Tier mit zervikaler Dislokation unter tiefer Narkose getötet, der Brustkorb eröffnet und durch einen Leberschnitt der Blutkreislauf eröffnet. Als nächstes wurde eine 10 ml-Spritze (B. Braun, Melsungen) gefüllt mit PBS und einer aufgesetzten Kanüle (30G, BD Mikrolance, Becton Dickson and Company, Franklin Lakes, USA) in die linke Kammer des Herzens eingeführt und langsam appliziert.

An der Farbe der Leber (je heller, desto besser wurden die Gefäße gespült) konnte man nun den Grad der Perfusion abschätzen und wenn nötig noch einmal 10 ml PBS nachinjizieren. Solange das Herz noch schlug war es möglich, das Kreislaufsystem zu perfundieren. Im Anschluss wurden beide Ohren mit einem Skalpellschnitt abgenommen und bis zur Weiterverarbeitung in PBS bei Raumtemperatur aufbewahrt.

3.1.2. Durchführung der Dermal Sheet-Präparation

Zunächst wurde eine kleine Petrischale (TC-Schale 35, Standard, Sarstedt, Nümbrecht) mit ca. 2 ml Ammoniumthiocyanat (Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe) befüllt und vor Licht geschützt auf Eis gestellt. Für die 2 entnommenen Ohren wurden ausreichend große Tropfen Haarentfernungscreme (Enthaarungscreme asid-med, Asid Bonz, Herrenberg) auf eine Petrischale (Falcon, Corning Science, Mexiko) aufgetragen; für jedes Ohr musste ein separater Tropfen vorbereitet werden. Nach vier Minuten Inkubationszeit wurden die Haare vorsichtig mit einem Tuch (Wypall, Kimberly-Clark, Koblenz) auf der dorsalen und ventralen Seite der Ohren entfernt. Im Anschluss wurden die Proben nacheinander in zwei mit PBS gefüllte 15 ml-Falcons (Polypropylene Conical Tube, Falcon, Corning Science, Mexiko) gegeben und leicht geschüttelt, um die verbleibende Creme zu entfernen. Im nächsten Schritt wurde mit zwei feinen Pinzetten die ventrale Seite von der dorsalen getrennt und mit der epidermalen Seite nach oben schwimmend auf das Ammoniumthiocyanat in der Petrischale aufgebracht und bei 37 °C für 35 min inkubiert. Nach abgelaufener Zeit wurde die Petrischale aus dem Inkubator entnommen und vor Licht geschützt auf Eis gestellt, damit die chemische Reaktion unterbrochen wird. Nach 10 min wurden die schwimmenden Proben entnommen und in eine mit PBS gefüllte Petrischale (Falcon, Corning Science, Mexiko) gelegt und vorsichtig mit zwei Pinzetten die dünne und durchscheinende Epidermis möglichst an einem Stück abgezogen. Die Epidermis wurde verworfen und die Dermal Sheets in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß (Eppendorf Tubes, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling) verbracht und für 5 min in PBS gewaschen. Zuletzt wurden die Dermal Sheets in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß mit 1 ml 4 % PFA (16 % Formaldehyde Solution, Methanol-free, Thermofisher Scientific, Rockford, USA, 1:4 in PBS verdünnt) verbracht, lichtgeschützt auf Eis für 20 min fixiert und danach weitere zwei Male für 5 min in PBS gewaschen.

Um die Dermal Sheets für spätere Weiterverarbeitung zu konservieren, wurden sie in PBS mit 0,05 % Natriumazid (Sodium Azide, ReagentPlus, ≥ 99.5 %, Sigma-Aldrich/Merck, Merck KGaA, Darmstadt) in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß bei 4 °C für höchstens eine Woche aufbewahrt.

3.2. Whole Mount Staining

Das Whole Mount Staining (WMS) bezeichnet eine immunhistochemische Fluoreszenzfärbung, bei der Organe oder Gewebestücke mit Antikörpern behandelt werden. Im Gegensatz zu Kryo- oder Paraffinschnitten, die nur wenige μm dick sind, liefern WMS-Färbungen einen multidimensionalen Blick auf Zellen und deren Zusammenhang im Gewebe. Mit modernen Mikroskopen, wie dem konfokalen Mikroskop oder der 2-Photonen-Mikroskopie, können 3D-Aufnahmen bis zu einer Tiefe von mehreren Millimetern von intakten Geweben angefertigt werden.

3.2.1. Das Prinzip der immunhistochemischen Färbung

Der Nachweis von Gewebsstrukturen beruht auf der Antigen-Antikörper-Reaktion, bei der Epitope von Geweben durch spezifische Antikörper (Immunglobuline) erkannt werden und eine spezifische Bindung eingehen können (Schlüssel-Schloss-Prinzip). Durch das an den Antikörper gekoppelte Fluorochrom wird am Ort der Bindung durch Anregung mit Fluoreszenzlicht oder Lasern ein sichtbares Signal erzeugt.

3.2.2. Durchführung des Dermal Sheet Whole Mount Stainings

Zuerst wurde die fixierte Probe in 200 μl Blocklösung mit 2 % FBS (FBS Superior, Biochrom GmbH, Berlin) und 10 % Goat Serum (Goat Serum, Sigma-Aldrich) in PBS für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von 4 μl anti-F4/80 und 4 μl anti-CD11c (bzw. anti-CD68) zur Blocklösung (siehe Tabelle 3) und die Probe wurde für 75 min bei 37 °C auf einem Thermomixer (Thermomixer comfort, eppendorf, Hamburg) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in 1 % Tween (0,1 % Tween20, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) in PBS wurden die Dermal Sheets in der Stocklösung (2 % FBS in PBS) mit 1 μl AF555 und 1 μl AF647 für weitere 40 min auf dem Thermomixer behandelt. Im letzten Schritt wurden die Ohren für 30 min bei Raumtemperatur in HOECHST (Hoechst 33342, Thermo Fisher Scientific, Rockford, Illinois, USA) in einer Konzentration von 1:1000 inkubiert.

Nach zweimaligem Waschen mit 1 % Tween und einmal mit PBS wurde die Probe mit Mounting Medium (Dako Fluorescent mounting medium, Dako North America Incorporation, CA, USA) mit der epidermalen Seite nach oben auf einem Objektträger (Menzel Gläser Superfrost Plus, Gerhard Menzel, Braunschweig) mit einem Deckglas (Menzel Gläser, Thermofisher Scientific) fixiert. Mit gängigem Nagellack wurde der Rand des Deckglases versiegelt, die Probe anschließend zum Trocknen für eine halbe Stunde bis Stunde bei Raumtemperatur lichtgeschützt in eine Mappe gelegt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Die gefärbten Dermal Sheets wurden innerhalb der nächsten drei Tage mit dem konfokalen Mikroskop analysiert.

Der Tabelle 4 sind die für das Whole Mount Staining herangezogene primäre Antikörper, sekundäre Antikörper und die jeweilige Verdünnung zu entnehmen. Die Färbung wurde ebenfalls mit korrespondierenden Isotypkontrollen durchgeführt, um die Spezifität der Färbung zu verifizieren.

Tabelle 4: Für das Whole Mount Staining herangezogene Antikörper

Antigen	Primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper	Isotyp-Kontrolle	Anzufärbende Struktur/Zellen
F4/80	Rat anti mouse F4/80 monoclonal Clone BM8, eBioscience	Goat anti rat AlexaFluor 555, Invitrogen, Thermofisher Scientific	Rat IgG2a kappa isotype control, Clone eBR2a, eBioscience	Makrophagen
	Konz.: 0,2 mg/mL	Konz.: 2 mg/mL	Konz.: 0.5 mg/mL	
	1:50*	1:200*		
CD11c	Armenian hamster anti mouse anti CD11c, N418, Thermofisher Scientific	Goat anti-armenian hamster AlexaFluor 647, abcam	Armenian hamster IgG isotype control, Clone eBio299Arm, eBioscience	Dendritische Zellen
	Konz.: 0,5 mg/mL	Konz.: 2 mg/mL	Konz.: 0.5 mg/mL	
	1:100*	1:200*		
CD68	Rabbit anti mouse CD68, polyclonal, abcam	Goat anti rabbit AlexaFluor 647, Life Technologies, Thermofisher Scientific		Makrophagen
	Konz.: 0,5 mg/ml	Konz.: 1 mg/mL		
	1:50*	1:200*		

* Verdünnung des Antikörpers

Vor dem Gebrauch der primären Antikörper empfahl es sich, diese für eine Minute bei 300 G zu zentrifugieren, um Antikörperaggregate und damit die Beeinflussungen des Whole Mount Stainings zu verringern.

3.3. Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie: Grundlagen und Prinzip

Da es mit der gängigen Methode der Epifluoreszenzmikroskopie nicht möglich war, die ca. 1 mm dicken Dermal Sheets zu mikroskopieren, fiel die Wahl auf das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM). Die konfokale Mikroskopie nutzt einen auf einen bestimmten Punkt (bis zu 0.5 μm) im Gewebe fokussierten Laserstrahl, um Fluorochrome dort anzuregen und das reflektierende Signal mit dem Objektiv einzufangen und abzubilden. Durch die in Abb. 21 sichtbare, eingebaute konfokale Blende (Pinhole) werden nur die Objektpunkte, die innerhalb der Fokusebene liegen, abgebildet. Zusätzlich unterdrückt sie Streulicht und es entsteht dadurch ein klares, kontrastreiches Bild. Die Lochblendentechnik erlaubt, dass der Detektor auf der anderen Seite der Blende das konfokale Licht einfängt und somit Punkt für Punkt abbilden kann. Es entsteht ein sogenannter optischer Schnitt in einer bestimmten Ebene der Probe. Durch das schnelle Scannen dieses Punktes in beide Richtungen auf der x-y-z-Achse werden diese Informationen an einen Computer gesendet, der die einzelnen Pixel zu einem scharfen und kontrastreichen dreidimensionalen Bild rekonstruiert. Durch eingebaute Emissionsfilter können bis zu vier Fluorochrome verschiedener Wellenlängen detektiert werden [250-252].

Der Laserstrahl gelangt über das Objektiv des Mikroskops in die Probe und regt dort Fluorochrome zur Emission von fluoreszierendem Licht an. Das Emissionslicht gelangt mittels desselben Objektivs über einen Farbteiler zum Detektor. Im Farbteiler wird die fluoreszierende Strahlung der Wellenlänge nach aufgeteilt. Das Pinhole verhindert, dass Lichtstrahlen, die von unten oder von oben auf die Blende treffen, an der Entstehung des Bildes beteiligt sind.

Die Vorteile des konfokalen Systems liegen in der Anfertigung kontrastreicher, hochauflösender Aufnahmen. Leider ist die geringe Eindringtiefe (in der Haut bis zu einer Tiefe von 200 μm) durch das Signal-Rausch-Verhältnis limitiert. Es kommt darüber hinaus schnell zu Photobleaching (Ausbleichen der Fluorochrome) und Phototoxizität [240].

3.3.1. Airyscan-Prinzip

Wie bereits erwähnt wird in der konventionellen konfokalen Mikroskopie die Auflösung durch die Größe des Pinhole bestimmt. Je höher die Auflösung des Bildes, desto niedriger ist die Lichtintensität, da nur wenige Photonen mit dem Detektor eingefangen werden können. Um dieses Problem zu lösen, wurde eine lichtempfindliche, mit kleinen Pinholes versehene Detektorfläche der Lochblende nachgeschaltet. Bei geöffneter Blende trifft nun das gesamte Licht auf den Airy-Disk-Flächendetektor und die einzelnen Signale werden durch die Software zu einem hochaufgelösten Bild mit optimiertem Signal-Rausch-Abstand zusammengesetzt [253].

Das für diese Arbeit verwendete CLSM (LSM 800 mit Airyscan, Carls Zeiss Microscopy, Jena) wurde für die Analyse der Whole Mount Staining-Präparate herangezogen, da durch die Entfernung der Epidermis die Eindringtiefe verringert werden konnte. Die hochauflösenden Aufnahmen wurden mit einem Wasserimmersions-Objektiv (20-fache Vergrößerung) und einem Bildausschnitt von $607,3 \mu\text{m} \times 607,3 \mu\text{m}$ bei einer Pixelzahl von 2084×2084 erstellt. Es wurden damit die Einzelbilder zur Auszählung der CX₃CR1⁺-Zellen und z-Stack- Aufnahmen erstellt.

3.3.2. Auswertung des Whole Mount Stainings mit dem CLSM

Die Aufnahmen am CLSM wurden mit dem Softwareprogramm ZEN (ZEN Mikroskopsoftware, Carls Zeiss Microscopy, Jena) angefertigt und ausgewertet. Hierzu wurden die Zellen in den einzelnen Kanälen gezählt und anschließend der Mittelwert von $n = 3$ gebildet.

4. Versuchsplanung und Durchführung

In vivo-Versuche

Tabelle 5: CX₃CR1GFP-Tiere mit und ohne Laserverletzung, Analyse der Bewegungsrichtung der neutrophilen Granulozyten

Versuch	Stamm	Genotyp	Geschlecht	Alter	Anzahl n
Mit Verletzung	CX ₃ CR1GFP	ki/wt	m	8-16 Wochen	4
Ohne Verletzung	CX ₃ CR1GFP	ki/wt	m	8-16 Wochen	4

Tabelle 6: CX₃CR1GFP-Tiere zur Depletion der neutrophilen Granulozyten

Versuch	Stamm	Genotyp	Geschlecht	Alter	Anzahl n
Ly6GPE	CX ₃ CR1GFP	ki/wt	w	8-16 Wochen	4
Isotyp Kontrolle	CX ₃ CR1GFP	ki/wt	w	8-16 Wochen	4

Tabelle 7: CX₃CR1GFP-Tiere zur Durchführung der Versuche mit HMGB1-Redoxformen und Kontrollen

Versuch	Stamm	Genotyp	Geschlecht	Alter	Anzahl n
dsHMGB1	CX ₃ CR1GFP	ki/wt	m	8-16 Wochen	4
mutHMGB1	CX ₃ CR1GFP	ki/wt	m	8-16 Wochen	4
PBS- Kontrolle	CX ₃ CR1GFP	ki/wt	m	8-16 Wochen	6

Tabelle 8: CX₃CR1GFP-Tiere zur Durchführung der Versuche mit BoxA und Kontrollen

Versuch	Stamm	Genotyp	Geschlecht	Alter	Anzahl n
BoxA	CX ₃ CR1GFP	ki/wt	w	8-16 Wochen	3
PBS- Kontrolle	CX ₃ CR1GFP	ki/wt	w	8-16 Wochen	4

Tabelle 9: C57BL/6J-Donortiere in CX₃CR1GFP-Empfängertiere

Stamm	Genotyp	Geschlecht	Alter	Anzahl n
C57BL/6J	wt/wt	m	8-16 Wochen	3
CX ₃ CR1GFP	ki/wt	m	8-16 Wochen	5

Tabelle 10: CX₃CR1GFP-Donortiere in C57B6/J-Empfängertiere

Stamm	Genotyp	Geschlecht	Alter	Anzahl n
CX ₃ CR1GFP	ki/wt	m	8-16 Wochen	3
C57BL/6J	wt/wt	m	8-16 Wochen	6

Tabelle 11: Clec9a-Cre;Rosa26-tomato;CX₃CR1GFP-Tiere zur Untersuchung der Dendritenbildung von CX₃CR1⁺- und Clec9a⁺-Zellen nach Laserverletzung

Stamm	Genotyp	Geschlecht	Alter	Anzahl n
Clec9a-Cre;Rosa26- tomato;CX ₃ CR1GFP	T/wt ki/wt	w	8-16 Wochen	3

Ex vivo-VersucheWhole Mount Staining:**Tabelle 12: CX₃CR1GFP-Tiere zur Durchführung der histologischen Färbung nach Laserverletzung**

Stamm	Genotyp	Geschlecht	Alter	Anzahl n
CX ₃ CR1GFP	ki/wt	m	10-16 Wochen	3

5. Statistische Auswertung

Nachdem alle Versuche durchgeführt worden sind, wurde die statistische Auswertung anhand der gewonnenen Daten unter Zuhilfenahme des Softwareprogrammes SigmaPlot 13.0 (Systat Software Inc. (SSI), San Jose, California, USA) vorgenommen. Bei den CX₃CR1GFP-Tieren mit und ohne Laserverletzung, der Depletion der neutrophilen Granulozyten/Isotyp-Kontrolle und BoxA/Kontrolle wurden jeweils die Gruppen mit ihren Kontrollgruppen verglichen und eine statistische Signifikanz bei einem p-Wert von $p < 0,05$ festgelegt. Zur Ermittlung des p-Wertes kam der t-test zum Einsatz. Im Falle der HMGB1-Gruppe wurde ein ANOVA-Test durchgeführt: Mit SigmaPlot wurde zuerst auf eine positive Normalverteilung getestet und die Varianzhomogenität überprüft. Danach wurde der ANOVA-Test angewandt und durch eine Bonferroni-Adjustierung die p-Werte der einzelnen Gruppen ermittelt.

Die Zuwachsrate der Dendritenbildung der gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen wurde durch die AUC (area under the curve) mit der Bland-Methode ermittelt [254]. In den Graphen sind sowohl die eingefärbten Flächen für die AUC als auch die Mittelwerte der Standardfehler (SEM) zum jeweiligen Zeitpunkt angegeben. Die Berechnung des dimensionslosen Effektmaßes Cohen's d wurde durch eine Kalkulation nach Nakagawa und Cuthill et al. durchgeführt: Ein geringer Effekt liegt bei allen Werten für $d < 0,5$ vor. Ein Effekt der mittleren Stärke ergibt sich bei $d \geq 0,5$; alle Werte, die größer sind als $d > 0,8$ sind als starke Effekte zu benennen [255].

Die *ex vivo*-Charakterisierung der CX₃CR1⁺-Zellen wurde in einem Kreisdiagramm prozentual dargestellt.

Die Auswertung der Knochenmark-Transplantationen und die *in vivo*-Versuche der Clec9a;Rosa26-tomato;CX₃CR1GFP-Tiere stellen ebenfalls beschreibende Statistiken dar: Hierfür wurde das Videomaterial auf Zellfortsatz bildende CX₃CR1⁺- und Clec9a⁺-Zellen untersucht und diese ausgezählt.

V. ERGEBNISSE

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Visualisierung und Analyse des Verhaltens gewebständiger CX₃CR1⁺-Zellen und ihrem Zusammenspiel mit neutrophilen Granulozyten im Krankheitsmodell der sterilen Inflammation. Zudem soll die Herkunft und der Phänotyp der CX₃CR1⁺-Zellen im Gewebe bestimmt werden.

Über das interstitielle Migrationsverhalten und die Aufgaben und Funktionen der neutrophilen Granulozyten wurden in der Vergangenheit bereits Publikationen veröffentlicht. Eine mögliche Beeinflussung von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten im Zusammenhang mit der Migration wurde nur unzureichend beschrieben [120, 136, 205-208]. Darüber hinaus gibt es noch keine Antworten auf die genauen Mechanismen der Interaktionen von gewebständigen Makrophagen und neutrophilen Granulozyten in der sterilen Inflammation. Außerdem ist nicht geklärt, wie sich gewebständige Makrophagen *in vivo* unter Einfluss einer sterilen Inflammation verhalten und ob es eine Änderung der phänotypischen Merkmale gibt.

In der vorliegenden Arbeit wurden Zellinteraktionen, Verhalten und Mechanismen der sterilen Entzündung *in vivo* mittels intravitaler 2-Photonen-Mikroskopie über die Zeit untersucht. Dabei lag der Fokus auf der Interaktion von gewebständigen CX₃CR1⁺-Zellen mit neutrophilen Granulozyten. Darüber hinaus wurde deren Verhalten in Abwesenheit von neutrophilen Granulozyten, unter Einfluss von HMGB1 und dessen Inhibitor BoxA analysiert. Anhand der Verwendung von Knochenmarkchimären wurde die Herkunft der gewebständigen CX₃CR1⁺-Zellen aufgeklärt. Für die weitere Charakterisierung dieser Zellen wurden *ex vivo* immunhistochemische Färbungen mit spezifischen Antikörpern durchgeführt.

Mit Hilfe des Clec9a-Cre;Rosa26-tomato;CX₃CR1GFP-Mausmodells wurden CX₃CR1⁺-Zellen *in vivo* weiter analysiert.

1. Das Verhalten gewebsständiger CX₃CR1⁺ - Zellen in der sterilen Inflammation

Zunächst erfolgte die Untersuchung des Verhaltens gewebsständiger CX₃CR1⁺-Zellen unter Bedingungen einer sterilen Entzündung über einen Zeitraum von sechs Stunden intravitalmikroskopisch in CX₃CR1GFP-Tieren. Dabei lag der Fokus explizit auf die morphologische Veränderung der stationären interstitiellen CX₃CR1⁺-Zellen. Auch wurde untersucht, wie sich diese Zellen unter Ruhebedingungen ohne Laserverletzung im Gewebe verhalten.

In Abb. 23 ist das Sichtfeld des zu untersuchenden dermalen Gewebes durch ein 2-Photonen-Mikroskop zu verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. Gewebsständige CX₃CR1⁺-Zellen befanden sich bereits vor der Entzündung im Gewebe. In den Gefäßen waren neutrophile Granulozyten zu sehen, die jedoch im Blutstrom zirkulierten und nicht an den Gefäßwänden adhärten. Ein anderes Bild ergab sich, nachdem ein Gewebeschaden vorlag: Durch die Setzung des Laserschadens fand die Adhäsion und Diapedese der neutrophilen Granulozyten statt und diese gelangten durch interstitielle Migration schon nach kurzer Zeit zum Ort der Entzündung. Schwarmartig traten Neutrophile in das Gewebe über und sammelten sich im umliegenden Gewebe an.

Im Laufe der Entzündung wurden auch CX₃CR1⁺-Monozyten rekrutiert und fanden sich durch Extravasation und interstitielle Migration zusätzlich neben den gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen im Gewebe ein.

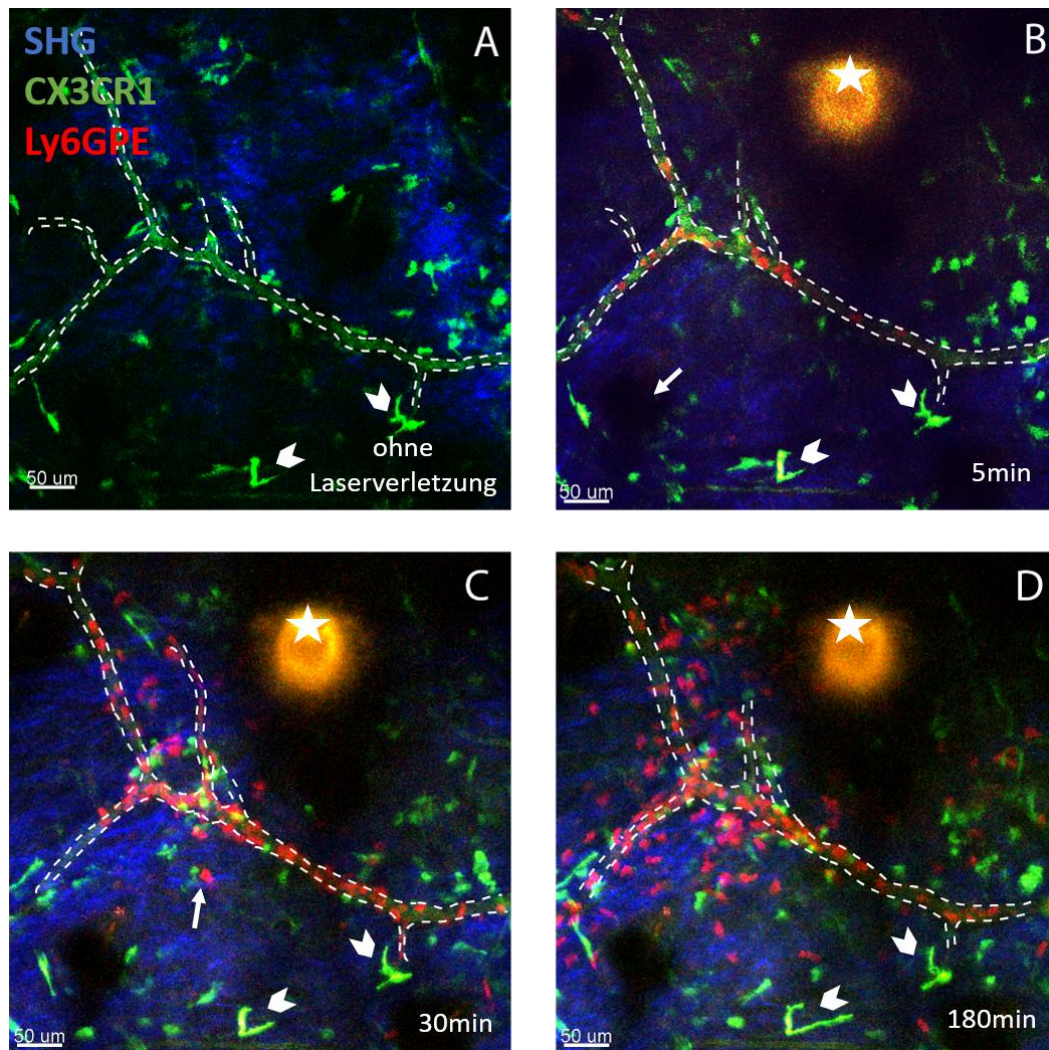


Abbildung 23: Sichtfeld des zu untersuchenden Gewebes zu Zeitpunkten vor und nach der Laser-Verletzung

Sicht durch das 2-Photonen-Mikroskop auf das zu untersuchende Ohr- und Gewebe: In Blau stellt sich das SHG Signal dar, die CX₃CR1⁺-Zellen fluoreszieren durch das exprimierte GFP in Grün. Neutrophile Granulozyten erscheinen in Rot. Postkapilläre Venolen sind mit weißen, gestrichelten Linien umrandet. Die Laser-Verletzung ist im jeweiligen Bild mit einem Sternchen markiert. Gewebsständige CX₃CR1⁺-Zellen sind mit kleinen weißen Pfeilspitzen kenntlich gemacht. Das Sichtfeld beträgt eine Größe von 588 µm x 588 µm. Der Maßstabsbalken gibt eine Länge von 50 µm an.

A: Aufnahme des Gewebes vor dem Setzen des Laserschadens im Ruhezustand. Im Interstitium sind gewebsständige CX₃CR1⁺-Zellen zu erkennen; in den Gefäßen sind keine neutrophilen Granulozyten zu finden. **B:** Aufnahme 5 min nach Setzen des Laserschadens; die Gewebsverletzung stellt sich als runde, autofluoreszierende Struktur dar, einige Neutrophile sammeln sich bereits in der Nähe der Laser-Verletzung in den Gefäßen an. Der weiße Pfeil mit Schaft markiert einen Haarfollikel. **C:** Aufnahme 30 min nach der Laser-Verletzung: Neutrophile treten jetzt aus den Gefäßen aus (in diesem Bild durch einen weißen Pfeil mit Schaft markiert) und migrieren zum Ort der Entzündung. **D:** Aufnahme 3 h nach Laser-Verletzung: Neben zahlreichen Neutrophilen migrieren auch Monozyten (ebenfalls in Grün) ins entzündete Gewebe.

In der ersten Untersuchung lag das Augenmerk auf der Morphologie und dem Verhalten der gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen unter Einfluss einer Laser-Verletzung.

Über den gesamten Zeitraum der intravitalmikroskopischen Untersuchung wurde das gleiche Sichtfeld beibehalten; die Videos wurden über einen Zeitraum von ca. 40 bis 45 min erstellt und anschließend ausgewertet. So konnten Verhaltensänderungen und morphologische Alterationen gewebsständiger CX₃CR1⁺-Zellen fast ununterbrochen erfasst werden.

Mit dem Fokus auf die gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen war Folgendes zu beobachten: In Abb. 24 ist exemplarisch die morphologische Veränderung einer gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zelle drei Stunden nach Laserverletzung über einen Zeitraum von 20 min zu sehen. Auf diesen Aufnahmen von verschiedenen Zeitpunkten ist zu sehen, dass sich im Laufe der Zeit eine markante Bildung von Zellausläufern (Dendritenbildung) abzeichnete. Im Durchschnitt konnte die Dendritenbildung ca. 180 min nach Setzen der Laserverletzung beobachtet werden.

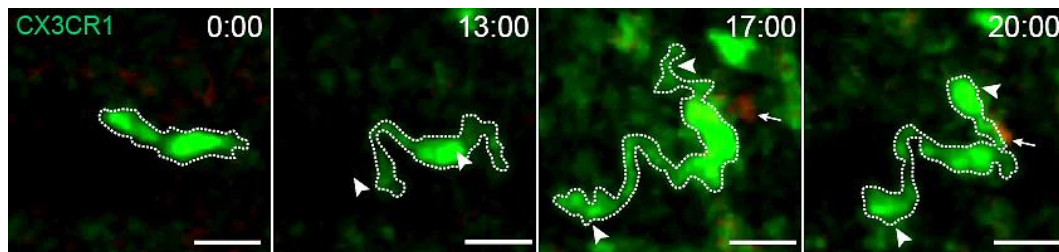


Abbildung 24: Morphologische Veränderung einer gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zelle zu verschiedenen Zeitpunkten unter Bedingung einer sterilen Inflammation

Darstellung einer gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zelle nach Induktion einer Laserverletzung: Zum Zeitpunkt 0 min (hier ca. 180 min nach dem Setzen der Laserverletzung) stellt sich die GFP⁺-Zelle noch in einer elliptischen Form dar. In den nächsten Minuten zeigt diese Zelle eine Bildung und Verlängerung von Zellfortsätzen, auf welche die zwei weißen Pfeilspitzen hinweisen. Die Verzweigung der Fortsätze erfährt zum Zeitpunkt 17 min ihr Maximum und zum Zeitpunkt 20 min erscheinen die Enden wieder in rundlicher Gestalt (siehe kleine weiße Pfeilspitzen). Der kleinere weiße Pfeil mit Schaft markiert einen neutrophilen Granulozyten (rot durch Anfärbung mit Ly6GPE) zum Zeitpunkt 17 min. Dieser tritt zum Zeitpunkt 20 min mit einem dendritischen Teil dieser Zelle in Kontakt (siehe ebenfalls weißer Pfeil mit Schaft). Der Maßstabsbalken gibt eine Länge von 20 µm an.

Die zunächst eher elliptische Form der Zelle nahm durch die Bildung von dendritischen Fortsätzen in kürzester Zeit eine komplexere Gestalt an. Jedoch war sichtbar, dass der Zellkörper am selben Ort blieb. Die Zelle vergrößerte ihren Aktionsradius allein durch die gebildeten Fortsätze.

Dass die Ausbildung von Zellausläufern auch über einen längeren Zeitraum erfolgen kann, wird durch ein weiteres Beispiel in Abb. 25 über die Dauer von ca. 45 min belegt: Die zunächst wie ein umgedrehtes „L“ anmutende gewebstständige CX₃CR1⁺-Zelle veränderte ihre Gestalt ca. 200 min nach Induktion der Laserverletzung. Sie verlängerte ihre Zellausläufer, deren Enden sich nochmals aufteilten.

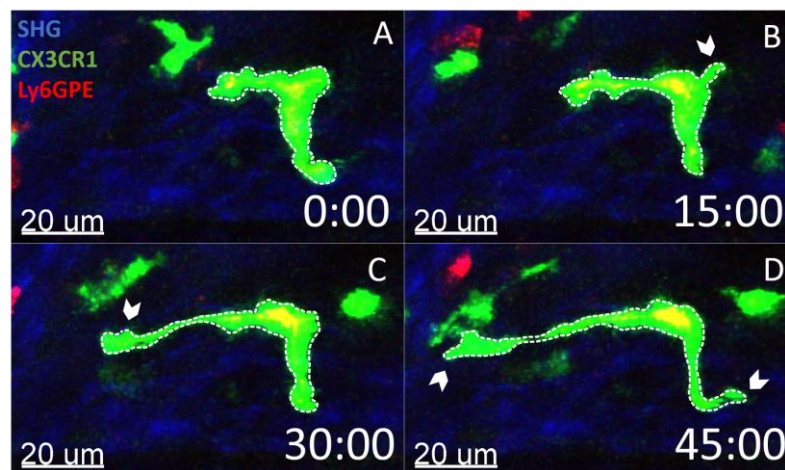


Abbildung 25: Dendritenbildung einer gewebstständigen CX₃CR1⁺-Zelle

In dieser Zeitabfolge eines 45 min langen Videos ist ebenfalls eine Verlängerung der Zellausläufer einer gewebstständigen CX₃CR1⁺-Zelle (grün) visualisiert. Das SHG Signal stellt sich in Blau dar. Ly6GPE⁺-neutrophile Granulozyten erscheinen in Rot. **A:** Zu Beginn der Aufnahme (ca. 200 min nach Induktion der Laserverletzung) ist eine GFP⁺-Zelle in Gestalt eines umgedrehten „L“s zusehen. **B:** 15 min später bildet diese Zelle einen ersten kleinen Zellausläufer aus (siehe kleine weiße Pfeilspitze). **C:** Zum Zeitpunkt von 30 min hat sich der kleine Dendrit wieder zurückgebildet und ein anderer Teil der Zelle verlängert sich (siehe kleine weiße Pfeilspitze). **D:** Nach 45 min ist deutlich zu sehen, dass die Zelle durch die Ausbildung von Zellausläufern an beiden Enden verlängert ist. Kleine weiße Pfeilspitzen weisen auf die Position dieser Dendriten hin.

Im nächsten Schritt erfolgte die Quantifizierung der dendritenbildenden gewebstständigen CX₃CR1⁺-Zellen über einen Zeitraum von fünf Stunden. Hiermit sollten die morphologischen Veränderungen dieser Zellen über die Zeit nach Laserverletzung quantifiziert werden. Zur Überprüfung des Zellverhaltens im Ruhezustand wurde eine Kontrollgruppe ohne Laserverletzung auf die gleiche Weise untersucht. Es wurden durch kontinuierliche *in vivo*-Aufnahmen die Zeitpunkte der Bildung von Dendriten der gewebstständigen CX₃CR1⁺-Zellen ermittelt.

In Abb. 26 ist die Anzahl der dendritenbildenden gewebstständigen CX₃CR1⁺-Zellen pro Sichtfeld unter Ruhebedingungen und unter Einfluss einer sterilen Entzündung dargestellt.

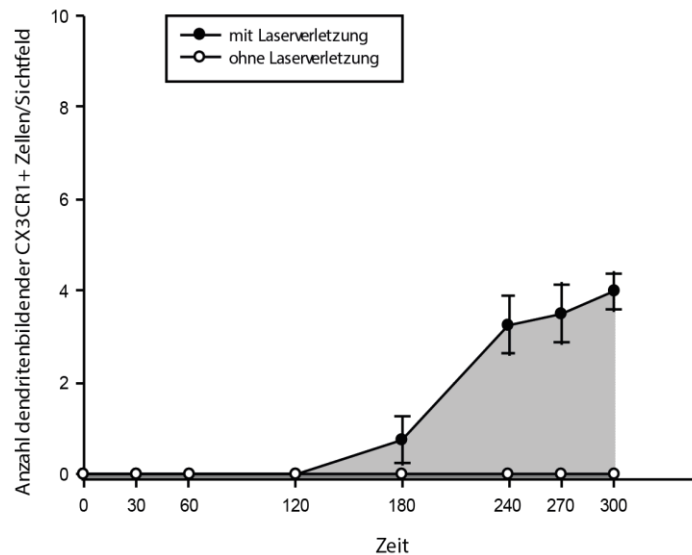


Abbildung 26: Anzahl der dendritenbildenden gewebsständigen CX₃CR1⁺- Zellen mit und ohne lokalem Laserschaden

Die Gruppe mit Laserverletzung ist mit dem Symbol ● dargestellt, während die Kontrollgruppe ○ ohne Laserschaden mikroskopiert wurde. Die SEM-Werte sind ebenfalls dieser Darstellung zu entnehmen, die grau eingefärbten Flächen stellen die AUC dar. Die Anzahl der dendritenbildenden gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen ist über einen Zeitraum von 300 min erfasst worden. Die Ausbildung von Zellausläufern in der Gruppe mit Induktion eines Gewebeschadens zum Zeitpunkt 0 min beginnt im Durchschnitt zum Zeitpunkt 180 min und nimmt bis zum Zeitpunkt 300 min um ca. 85 % zu. Daneben ist eine Kontrollgruppe ohne Laserschaden aufgetragen, in der keine Zellfortsatzbildung der gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen von Zeitpunkt 0 min bis Zeitpunkt 300 min zu verzeichnen ist. Das Sichtfeld der ausgezählten Zellen beträgt 588 µm x 588 µm. Die jeweilige Größe der Gruppe beträgt n = 4.

In der Gruppe mit Laserverletzung konnte durch den Entzündungsreiz ein signifikanter Anstieg der dendritenbildenden gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen um 85 % gegenüber der Gruppe unter Ruhebedingungen festgestellt werden ($p < 0,05$). Es konnte ein starker Effekt durch die Effektgröße von $d = 2,29$ gegenüber der Kontrollgruppe erfasst werden (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Statistische Werte der dendritenbildenden gewebsständigen CX₃CR1⁺ Zellen/Sichtfeld mit und ohne Laserverletzung

dendritenbildende gewebsständige CX ₃ CR1 ⁺ -Zellen	Zellzahl über die Zeit/Sichtfeld	
	ohne Laserverletzung	mit Laserverletzung
AUC	0 +/- (0)	345 +/- (167,03)
Effektgröße	2,92	
p- Wert	0,006*	

Signifikante Werte ($p < 0,05$) sind fettgedruckt und mit * kenntlich gemacht. Bei den AUC Werten sind (eingeklammert) die SEM Werte zu lesen.

In der Kontrollgruppe ohne Entzündungsreiz war von Beginn bis Ende der intravitalmikroskopischen Untersuchung keine Bildung von Zellausläufern durch gewebständige CX₃CR1⁺-Zellen zu beobachten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Auslöser der Ausbildung von Zellfortsätzen der gewebständigen CX₃CR1⁺-Zellen die sterile Entzündung des umliegenden Gewebes ist. Unter Ruhebedingung ist keine Bildung von Zellausläufern zu verzeichnen. Die Bildung von dendritenartigen Zellausläufern stellt also keine physiologische Erscheinung im Gewebe dar und wird durch den Laserschaden ausgelöst.

2. Interaktion von neutrophilen Granulozyten und gewebständigen CX₃CR1⁺ - Zellen im interstitiellen Raum unter Einfluss der Laserverletzung

Neben der Änderung des Phänotyps wurde der Fokus nun auf die Kontakte und möglichen Interaktionen von dendritenbildenden gewebständigen CX₃CR1⁺- Zellen mit weiteren Immunzellen gelegt.

Intravitalmikroskopische Aufnahmen von CX₃CR1GFP-Tieren zeigten, dass durch die Laserverletzung angelockte neutrophile Granulozyten durch ihr interstitielles Bewegungsmuster auf stationäre CX₃CR1⁺-Zellen trafen. Durch diese Begegnung ergaben sich interstitielle Kontakte von Neutrophilen mit stationären CX₃CR1⁺- Zellen. Diese Interaktionen der beiden Zellgruppen wurden *in vivo* in CX₃CR1GFP-Tieren weiterführend untersucht.

Eine deutliche Interaktion von einem neutrophilen Granulozyten mit einer stationären CX₃CR1⁺-Zelle unter Einfluss der Laserverletzung ist exemplarisch in Abb. 27 dargestellt. Die hier zu sehende gewebständige CX₃CR1⁺-Zelle, mit der der Neutrophile kommunizierte, hatte bereits zu einem Zeitpunkt > 180 min nach dem Setzen der Laserverletzung, Zellfortsätze ausgebildet.

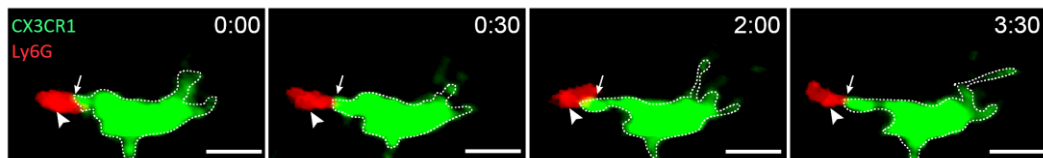


Abbildung 27: Kontakt eines neutrophilen Granulozyten mit einer dendritenbildenden gewebständigen CX₃CR1⁺-Zelle

Ein interstitiell migrierender neutrophiler Granulozyt (rot, kleine weiße Pfeilspitze) bei der Kontaktaufnahme mit einer gewebständigen CX₃CR1⁺-Zelle mit ausgeprägter Dendritenbildung (grün) zu einem Zeitpunkt > 180min nach Setzen der Laserverletzung. Über einen Zeitraum von ca. 3 min kommuniziert der Neutrophile mit einem dendritenartigen Teil dieser Zelle. Auf die Stelle der Interaktion weist ein weißer Pfeil mit Schaft hin. Der Maßstabsbalken gibt eine Länge von 20 µm an.

Zur weiteren Charakterisierung der Interaktionen der beiden Zellpopulationen wurden neutrophile Granulozyten vor, während und nach der Interaktion mit dendritenbildenden gewebständigen CX₃CR1⁺-Zellen verfolgt und deren Wege ausgewertet. Vergleichend wurde ihnen eine Gruppe ohne Interaktion zum gleichen Zeitpunkt nach einer Laserverletzung gegenübergestellt. Untersuchungen ergaben unterschiedliche Richtungsänderungen der Neutrophilen mit und ohne vorherigen Kontakt zu gewebständigen CX₃CR1⁺-Zellen mit Zellfortsatzbildung.

In Abb. 28 ist die Richtungsänderung der neutrophilen Granulozyten mit und ohne Interaktion mit gewebständigen dendritenbildenden CX₃CR1⁺-Zellen unter Einfluss der Laserverletzung aufgetragen: Aus dieser Darstellung geht deutlich hervor, dass ca. 90 Prozent der Neutrophilen, die in Kontakt mit gewebständigen CX₃CR1⁺-Zellen traten, von der Laserverletzung weg migrierten. Nur ca. 10 Prozent der Neutrophilen setzten nach der Interaktion unbeeinflusst ihren Weg zur Laserverletzung fort. Neutrophile, die keinen Kontakt mit dendritenbildenden gewebständigen CX₃CR1⁺-Zellen aufwiesen, migrierten zu ca. 80 Prozent weiterhin geradewegs zur Gewebsverletzung. Nur ca. 20 Prozent der neutrophilen Granulozyten änderten ihre Richtung auch ohne vorherige Interaktion mit einer stationären CX₃CR1⁺-Zelle.

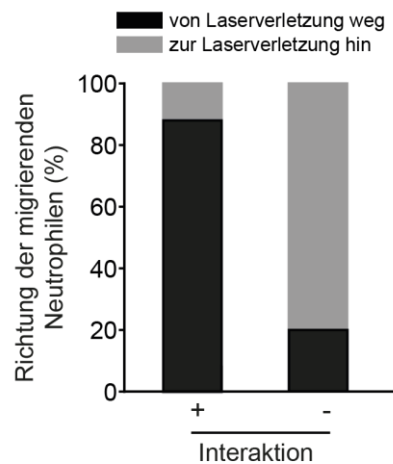


Abbildung 28: Bewegungsmuster der neutrophilen Granulozyten mit und ohne Interaktion mit dendritenbildenden gewebständigen CX₃CR1⁺-Zellen

Auf der y-Achse ist die Richtung der verfolgten migrierenden neutrophilen Granulozyten in Prozent aufgetragen. Die x-Achse gibt wieder, ob eine Interaktion mit dendritenbildenden gewebständigen CX₃CR1⁺-Zelle erfolgt ist. Die linke Säule beschreibt die Bewegungsrichtung der Neutrophilen nach Kontakt zu gewebständigen CX₃CR1⁺-Zellen, die rechte Säule zeigt die Bewegungsrichtung der Neutrophilen ohne vorherigen Kontakt mit diesen Zellen. Das + steht für eine Interaktion; das – steht für keine Interaktion von Neutrophilen mit gewebständigen CX₃CR1⁺-Zellen. Dieser Darstellung ist zu entnehmen, dass, nach Interaktion mit einer dendritenbildenden gewebständigen CX₃CR1⁺-Zelle, ca 90 % der Neutrophilen in die entgegengesetzte Richtung des Entzündungsortes migrieren. Ca. 10 % der Neutrophilen setzen nach der Interaktion unbeeinflusst ihren Weg zur Laserverletzung fort. Umgekehrt ist dem Graphen zu entnehmen, dass Neutrophile ohne Kontakt zu dendritenbildenden gewebständigen CX₃CR1⁺-Zelle zu 80 % weiterhin geradewegs zur Laserverletzung wandern. Nur ca. 20 % der Neutrophilen ändern ihre Richtung auch ohne Kontakt zu einer gewebständigen CX₃CR1⁺-Zelle. Das Sichtfeld der ausgezählten Zellen beträgt 588 µm x 588 µm und die Anzahl der ausgezählten Zellen/Tier (n=4) beträgt ca.20 Zellen/Gruppe.

Neben der Richtungsänderung wurden in einer weiteren Untersuchung auch andere Parameter bezüglich der Neutrophilenmigration erhoben. Durch die Analyse des Bewegungsmusters der neutrophilen Granulozyten konnte eine Änderung der Geschwindigkeit, der Verlagerung der Position der Zellen im Gewebe (Versetzungsrate) und der Zielgerichtetheit der Bewegung festgestellt werden, wenn sie zuvor in Kontakt mit stationären CX₃CR1⁺-Zellen getreten waren. Auch hierfür wurden Neutrophile mit und ohne Interaktion mit dendritenbildenden gewebständigen CX₃CR1⁺-Zellen ebenfalls einer Analyse unterzogen.

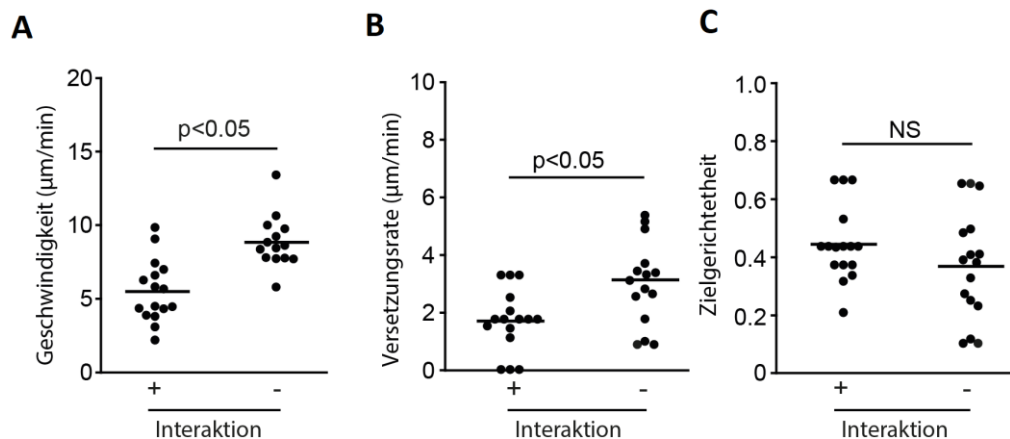


Abbildung 29: Analyse des Bewegungsmusters der neutrophilen Granulozyten mit und ohne Interaktion mit dendritenbildenden gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen

Die Abbildung zeigt drei Graphen, die das Ergebnis der Analyse der Neutrophilenbewegung in Situationen mit und ohne Kontakt mit dendritenbildenden gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zelle veranschaulichen. Jeder schwarze Punkt steht für einen interstitiell migrierenden Neutrophilen, dessen Weg über den Zeitraum der Begegnung mit einer gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zelle verfolgt und analysiert wurde. **A:** Durch den Kontakt mit einer dendritenbildenden gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zelle verringert sich die Geschwindigkeit der Neutrophilen signifikant gegenüber der Gruppe ohne Kontakt zu Zellausläufern. **B:** Treten Neutrophile in Kontakt mit dendritenbildenden gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zelle, so verschiebt sich ihre Position im Gewebe signifikant geringer als die der Zellen der Kontrollgruppe ohne Kontakt. **C:** Bei der Erhebung der Zielgerichtetheit (einer dimensionslosen Größe) der Neutrophilen kann kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die jeweilige Größe der Gruppe beträgt $n = 4$, die Anzahl der analysierten Zellen sind den jeweiligen Graphen zu entnehmen.

Abb. 29 zeigt, dass Neutrophile, die zuvor Kontakt zu Zellen mit dendritenartigen Zellausläufern hatten, sich langsamer im Gewebe bewegten als Neutrophile, die kontaktlos ihre Migration fortsetzten. Hier konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe mit Kontakt zu dendritenbildenden gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen im Unterschied zur Zellgruppe ohne Kontakt festgestellt werden ($p < 0,05$). Neutrophile, die in Kontakt mit dendritenbildenden gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen in einer sterilen Entzündung traten, verringerten folglich ihre Migrationsgeschwindigkeit. Dieses Verhalten untermauert die Interaktion der beiden Zelltypen. Des Weiteren war in den Untersuchungen zu sehen, dass Neutrophile mit Interaktion mit einer dendritenbildenden gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zelle eine signifikant geringere Verlagerung der Position aufwiesen als Zellen ohne Kontakt ($p < 0,05$). Dies bestärkt die Annahme einer Neutrophilen-Makrophagen-Interaktion.

Zuletzt wurden die Neutrophilenbewegungen auf Zielgerichtetheit untersucht: hier zeigte sich, dass es keinen signifikanten Unterschied in der Gruppe mit Kontakt gegenüber der Gruppe ohne Kontakt gegeben hat. Neutrophile Granulozyten migrierten mit und ohne Interaktion mit dendritenbildenden gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen mit einer ähnlichen zielgerichteten Bewegung.

In diesem Kapitel wurde die Interaktion von dendritenbildenden gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen mit neutrophilen Granulozyten und deren Einfluss auf die Richtungsänderung dieser Zellen aufgezeigt. Treten Neutrophile in Kontakt mit gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen, so werden sie vom Ort der Entzündung abgelenkt und steuern in die entgegengesetzte Richtung. Dieser starke Zusammenhang wurde auch durch die Analyse des Bewegungsprofils der neutrophilen Granulozyten untermauert: treten Neutrophile in Kontakt mit dendritenbildenden gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen so verlangsamten sie signifikant ihre Geschwindigkeit und wiesen eine ebenfalls signifikant geringere Versetzungsrate im Gewebe auf. Umgekehrt migrierten Neutrophile ohne Kontakt mit diesen Zellen schneller durch das Gewebe und konnten größere Distanzen zurücklegen. Somit führt der Kontakt von Neutrophilen mit dendritenbildenden gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen zu einer Aktivitätsdämpfung der Neutrophilen.

3. Auswirkungen der Depletion neutrophiler Granulozyten auf die Ausbildung von Zellausläufern der gewebsständigen CX₃CR1⁺ - Zellen

Da die vorherigen Untersuchungen eine direkte Interaktion von dendritenbildenden gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen mit neutrophilen Granulozyten aufzeigte, wurde dieses Verhalten im weiteren Verlauf näher analysiert. Um die Mechanismen der Zellausläuferbildung weiter zu untersuchen, kam eine Methode zum Einsatz, mit der neutrophile Granulozyten aus dem Organismus entfernt werden können.

Mittels eines Ly6G-Antikörpers wurden die neutrophilen Granulozyten in CX₃CR1GFP-Tieren depletiert. Außerdem wurde eine Kontrollgruppe auf die gleiche Weise mit dem korrespondierenden Isotyp behandelt. Zum Zeitpunkt 0 wurde ein Laserschaden im Gewebe gesetzt und die gewebsständigen CX₃CR1⁺- Zellen auf Dendritenbildung über einen Zeitraum von fünf Stunden intravitalmikroskopisch untersucht.

Gewebsständige CX₃CR1⁺-Zellen mit Bildung von Zellfortsätzen eines Sichtfeldes wurden ausgezählt und der Zellanzahl einer Isotyp-Kontrollgruppe gegenübergestellt. Durch intrakardiale Blutabnahme und anschließender Analyse wurde die Depletion der neutrophilen Granulozyten bei allen Tieren dieser Versuchsgruppe bestätigt.

Die Ergebnisse der Untersuchung auf Dendritenbildung mit und ohne Depletion der neutrophilen Granulozyten wurden im folgenden Graphen (Abb. 30) zusammengefasst.

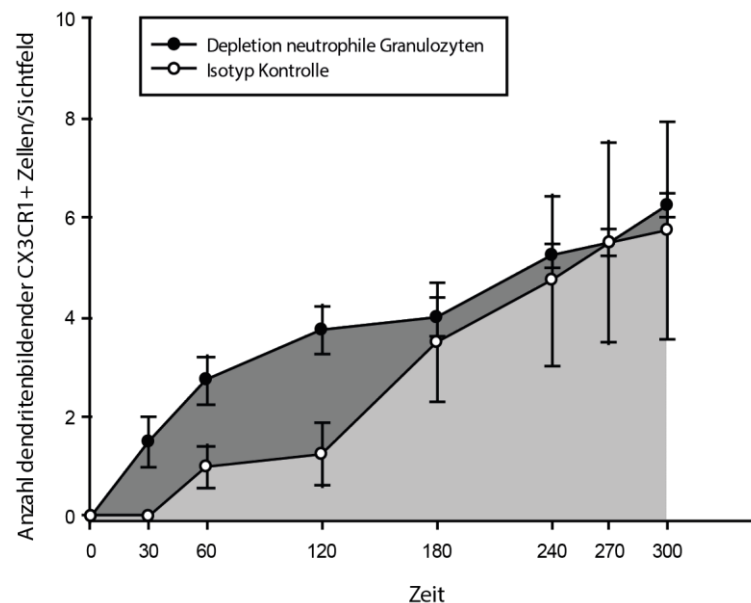


Abbildung 30: Anzahl der gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen über die Zeit mit und ohne Einfluss der Neutrophilendepletion

In dieser Abb. ist die Anzahl der dendritenbildenden gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen über einen Zeitraum von 300 min aufgetragen. Die grau eingefärbten Flächen repräsentieren die jeweilige AUC. Die mit ● markierten Punkte stellen die Anzahl der dendritenbildenden gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen pro Sichtfeld unter Einfluss der Neutrophilendepletion dar, während ○ markierte Punkte die Anzahl der gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen nach Injektion der Isotyp Kontrolle aufzeigen. Diesem Graphen ist zu entnehmen, dass keine signifikante Erhöhung der Anzahl dendritenbildender gewebsständiger CX₃CR1⁺-Zellen durch die Depletion von neutrophilen Granulozyten zu sehen ist. Doch ist durchaus eine frühere Dendritenbildung der mit Ly6GPE- behandelten Gruppe zu erkennen: bereits 30 min nach Setzen der Laserverletzung sind erste dendritenbildende Zellen zu zählen. In der Isotyp-Kontrollgruppe erscheinen dendritenbildende Zellen erst nach einer Dauer von 60 min nach Induktion der Entzündung. Gegen Ende der Untersuchung zeigen beide Gruppe eine fast identische Anzahl an dendritenbildenden Zellen. Das Sichtfeld der ausgezählten Zellen beträgt 588 µm x 588 µm. Die jeweilige Größe der Gruppe beträgt n = 4.

Aus Abb. 30 ist zu entnehmen, dass gewebsständige CX₃CR1⁺-Zellen Ly6G-behandelter Tiere bis zu einem Zeitpunkt von 120 min eine höhere Ausbildung von Zellausläufern als die Isotyp-Kontrollgruppe aufwiesen.

Durch die Berechnung des p-Wertes ergab sich aber kein signifikanter Unterschied (siehe Tabelle 14). Die Effektgröße unterstützt diesen Befund durch einen geringen Effekt ($d < 0,5$). Die Ergebnisse dieser Untersuchung geben Hinweis darauf, dass die Neutrophilendepletion und das Auftreten der Dendritenbildung in einem geringen Umfang voneinander abhängig sind und Neutrophile gewebständige CX₃CR1⁺-Zellen beeinflussen.

Der Zeitpunkt des Auftretens der Dendritenbildung differenzierte sich ebenfalls in den verschiedenen Gruppen: Nach 30 min waren in der mit Ly6G behandelten Gruppe bereits erste gewebständige CX₃CR1⁺-Zellen mit Ausbildungen von Zellfortsätzen zu erkennen. Zum gleichen Zeitpunkt waren aber noch keine Zellen mit Zellfortsätze in der Isotyp-Kontrollgruppe im Gewebe sichtbar. Ab einem Zeitpunkt von 270 min zeigten beide Gruppe fast identische Anzahlen an dendritenbildenden Zellen.

Tabelle 14: Statistische Auswertung der Depletionsgruppe und Isotyp-Kontrollgruppe

dendritenbildende gewebständige CX ₃ CR1 ⁺ - Zellen	Zellzahl über die Zeit/Sichtfeld	
	Depletion	Isotyp-Kontrolle
AUC	1091,25 +/- (134,93)	948,75 +/- (659,70)
Effektgröße	0,3	
relativer Unterschied (%)	86,94	
Zuwachs in %	15,02	
p- Wert	0,687	

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es durch die Depletion neutrophiler Granulozyten zu einer früheren Dendritenbildung gewebständiger CX₃CR1⁺-Zellen kam, die eine höhere Anzahl dendritenbildender Zellen im Zeitraum von zwei Stunden nach Setzen der Laserverletzung gegenüber der Isotyp- Kontrollgruppe aufwies.

4. Zusammenhang von Neutrophileneinstrom und der Bildung von Zellfortsätzen unter Einwirkung von BoxA

Der nächste Schritt diente der Suche nach dem Stimulus für die Ausbildung von Zellfortsätzen der CX₃CR1⁺-Zellen. Hier wurde zunächst die Rolle des prototypischen DAMPs HMGB1 untersucht.

Dafür erfolgte vor der Laserverletzung die s.c.-Injektion des HMGB1-Inhibitors BoxA in CX₃CR1GFP-Tiere. Eine weitere Gruppe wurde als Kontrolle in derselben Weise mit dem Solvent PBS behandelt (BoxA-Kontrolle) und beide Gruppen über einen Zeitraum von fünf Stunden intravitalmikroskopisch untersucht.

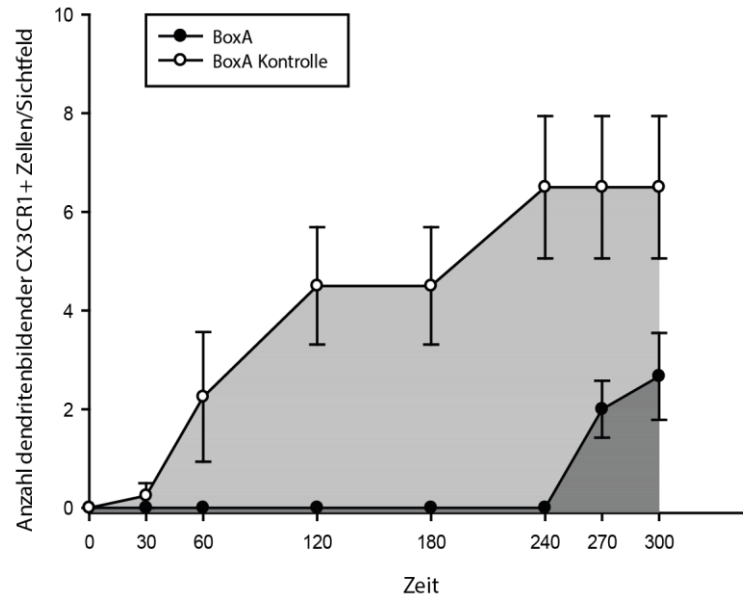


Abbildung 31: Gegenüberstellung der Untersuchung der Ausbildung von Zellausläufern unter Einfluss von BoxA und einer Isotyp-Kontrollgruppe mit PBS nach Setzen einer Laserverletzung

In diesem Graphen stellen die mit ● markierten Punkte die Anzahl der zu den Zeitpunkten gezählten gewebständigen dendritenbildenden CX₃CR1⁺-Zellen unter Einfluss von BoxA dar. Die mit ○ markierten Punkte dagegen repräsentieren die Anzahl der Zellen der Kontrollgruppe mit PBS. Die jeweilige AUC wird durch die in grau und dunkelgrau eingefärbten Flächen dargestellt. Der Zeitraum der Untersuchung beträgt fünf Stunden. Es ist zu sehen, dass in der mit BoxA-behandelten Gruppe die Ausbildung von Zellausläufern erst ab dem Zeitpunkt von 240 min beginnt. Dagegen sind erste Zellfortsätze in der mit dem Isotyp-behandelten Gruppe schon nach wenigen Minuten zu erkennen -bis zum einem Zeitpunkt von 240 min nimmt die Anzahl der Zellen mit dendritenartigen Ausläufern zu. Das Sichtfeld der ausgezählten Zellen beträgt 588 µm x 588 µm. Die BoxA-Gruppengröße ist n = 3 und die der Kontrollgruppe n = 4.

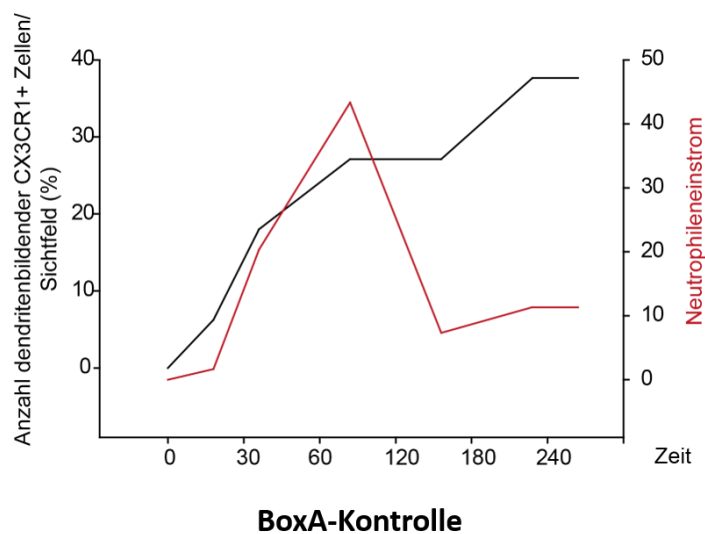
In der Abb. 31 ist zu sehen, dass die gewebständigen CX₃CR1⁺-Zellen in der, mit BoxA behandelten Gruppe, von Zeitpunkt 0 bis 240 min keine Zellausläufer zeigten. Erst ab Zeitpunkt 240 min bis 300 min wiesen ca. 30 Prozent der Zellen eine Bildung von dendritenartigen Fortsätzen auf. Dagegen zeigt die Kontrollgruppe mit dem Isotyp schon zu Beginn bis Ende des Versuches gegenüber der BoxA-Gruppe eine signifikante Bildung von Zellausläufern. Diese Beobachtung wurde durch einen p-Wert von p = 0,004 belegt und durch den relativen Unterschied und den Zuwachs untermauert (siehe Tabelle 15). Ebenfalls war ein starker Effekt von d = 3,75 zwischen beiden Gruppen auszumachen.

Tabelle 15: Statistische Auswertung der Gruppe mit BoxA und der mit dem Isotypen behandelten Kontrollgruppe

dendritenbildende gewebsständige CX ₃ CR1 ⁺ Zellen	Zellzahl über die Zeit/Sichtfeld	
	BoxA	BoxA Kontrolle
AUC	130 +/- (67,64)	1233,75 +/- (375,57)
Effektgröße	-3,75	
relativer Unterschied (%)	10,54	
Zuwachs in %	849,04	
p- Wert	0,004*	

Hervorzuheben ist auch, dass ab dem Zeitpunkt von 240 min, in der mit BoxA behandelten Gruppe, erste Zellen mit dendritenartigen Zellausläufern in Erscheinung traten.

Im gleichen Experiment wurde auch die Anzahl migrierender neutrophiler Granulozyten zur Laserverletzung erhoben. In der Abb. 32 ist in einem Graphen die prozentuale Anzahl gewebsständiger CX₃CR1⁺-Zellen in der BoxA-Kontrollgruppe über den Zeitraum von vier Stunden aufgetragen.

**Abbildung 32: Korrelation von Neutrophileneinstrom und Ausbildung von Zellausläufern nach Setzen einer Laserverletzung**

In diesem Graphen ist die Korrelation des Neutrophileneinstroms in ein Areal von 50 µm um die Laserverletzung mit dendritenbildenden gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen nach sc. Injektion von BoxA-Kontrolle (PBS) 30 min vor Induktion des Laserschadens zu sehen. Die schwarze Linie beschreibt das Verhalten der gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen unter Einfluss der Laserverletzung. Die rote Linie beschreibt den Verlauf des Neutrophileneinstroms in das Areal um die Laserverletzung über den Zeitraum von vier Stunden. Es ist zu sehen, dass mit dem kontinuierlichen Anstieg der Dendritenbildung gewebsständiger CX₃CR1⁺-Zellen der Einstrom der Neutrophilen nach ca. einer Stunde sein Maximum erreicht, um bis zum Zeitpunkt von ca. 180 min abzufallen. Das Sichtfeld der ausgezählten Zellen beträgt 588 µm x 588 µm. Die Gruppengröße der BoxA-Kontrolle ist n = 4.

In diesem Graphen ist zu sehen, dass mit kontinuierlicher Zunahme der Dendritenbildung die Anzahl der einströmenden Neutrophilen schon nach wenigen Minuten stark zunahm und nach ca. 100 min ihr Maximum erreichte. Ab diesem Zeitpunkt infiltrierten immer weniger Neutrophile das Areal um die Laserverletzung und die Anzahl der migrierenden Zellen fiel rapide ab. Zum Zeitpunkt von ca. 160 min befanden sich nur noch ein Bruchteil der Neutrophilen in der Umgebung der Laserverletzung.

Abb.33 zeigt dagegen den Verlauf der einströmenden Neutrophilen der mit BoxA behandelten Gruppe:

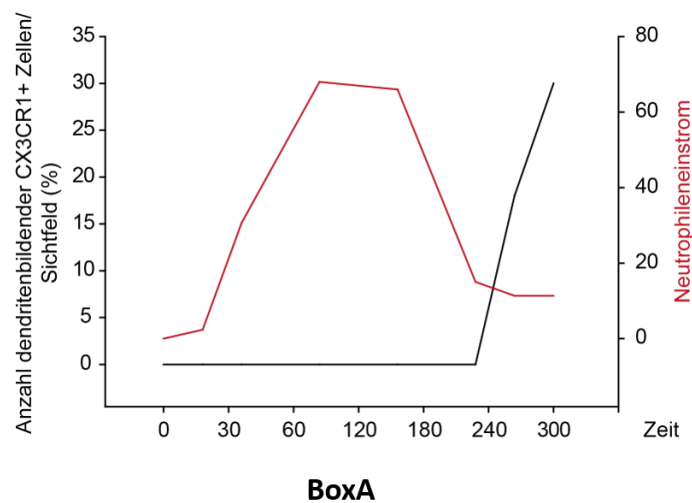


Abbildung 33: Korrelation von Neutrophileneinstrom und Ausbildung von Zellausläufern unter Einfluss von BoxA

In diesem Graphen ist die Korrelation des Neutrophileneinstroms in ein Areal von 50 μm um die Laserverletzung mit dendritenbildenden gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen nach sc. Injektion von BoxA 30 min vor Induktion des Laserschadens zu sehen. Die schwarze Linie beschreibt das Verhalten der gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen unter Einfluss der Laserverletzung. Die rote Linie beschreibt den Verlauf des Neutrophileneinstroms in das Areal um die Laserverletzung über den Zeitraum von fünf Stunden. Es ist zu sehen, dass durch BoxA es zu keiner Ausbildung von Zellausläufern gewebsständiger CX₃CR1⁺-Zellen bis zu einem Zeitpunkt von ca. vier Stunden kommt. Der Einstrom der Neutrophilen erreicht nach ca. einer Stunde sein Maximum, hält sich dort auf einem Plateau für ca. zwei weitere Stunden, um ab ca. 180 min abzufallen. Das Sichtfeld der ausgezählten Zellen beträgt 588 μm x 588 μm . Die BoxA-Gruppengröße beträgt n = 3.

Diesem Graphen ist zu entnehmen, dass der Neutrophileneinstrom in der mit BoxA behandelten Gruppe ebenfalls bereits in den ersten Minuten nach Verletzung des Gewebes einsetzte. Zwischen den Zeitpunkten 30 min und 60 min stieg die Anzahl der Neutrophilen von 10 Zellen auf eine maximale Anzahl von 70 Zellen pro Sichtfeld an.

Zwischen den Zeitpunkten 120 min und 180 min war die Anzahl der Zellen stabil und der Neutrophileneinstrom pendelte sich auf diesem Plateau ein. Ab dem Zeitpunkt von ca. 200 min bis zum Ende der mikroskopischen Aufnahmen zum Zeitpunkt von 300 min nahm die Anzahl der zur Laserverletzung migrierenden Neutrophilen wieder ab. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war ein prolongierter und geringerer Neutrophileneinstrom zu beobachten.

In Abb. 33 sind auch die Ergebnisse der ausgezählten dendritenbildenden gewebständigen CX₃CR1⁺-Zellen in der mit BoxA behandelten Gruppe zu sehen: Wie bereits in der vorherigen Abb. 31 beschrieben, waren die ersten dendritenbildenden gewebständigen CX₃CR1⁺-Zellen ab dem Zeitpunkt von 240 min sichtbar. Einen kurzen Zeitpunkt früher sank die Anzahl der migrierenden neutrophilen Granulozyten auf ein niedriges Plateau. Die Ausbildung von Zellfortsätzen der gewebständigen CX₃CR1⁺-Zellen korreliert also zeitlich mit der Abnahme der Neutrophilenmigration zur Laserverletzung.

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass BoxA die Dendritenbildung von gewebständigen CX₃CR1⁺-Zellen signifikant unterdrückt und HMGB1 somit ein Stimulus für die Ausbildung von Zellausläufern bei steriler Inflammation ist. Dabei konnte eine zeitliche Kohärenz zwischen dem verminderten prolongierten Neutrophileneinstrom und dem vermehrten Auftreten der dendritenbildenden Zellen zur Laserverletzung festgestellt werden.

5. Abhängigkeit der Ausbildung von Zellausläufern von HMGB1

Ein weiteres Experiment diente der Untersuchung der Auswirkungen unterschiedlicher Redoxformen des DAMPs HMGB1 auf die Ausbildung von Zellausläufern der gewebständigen CX₃CR1⁺-Zellen. Dazu erfolgte vor dem Beginn der intravitalmikroskopischen Untersuchungen eine Behandlung der Gruppe von CX₃CR1GFP-Tieren durch s.c.-Injektion mit dem nicht oxidierbaren mutHMGB1. Weitere Tiere wurden mit oxidiertem dsHMGB1 gespritzt und einer Kontrollgruppe wurde PBS im gleichen Zeitabstand verabreicht. Mit dem 2-Photonen-Mikroskop erfolgte im Ohrmodell über einen Zeitraum von 270 min die Anfertigung intravitalmikroskopischer Aufnahmen. Im Anschluss wurde die prozentuale Anzahl der dendritenbildenden gewebständigen CX₃CR1⁺-Zellen ermittelt.

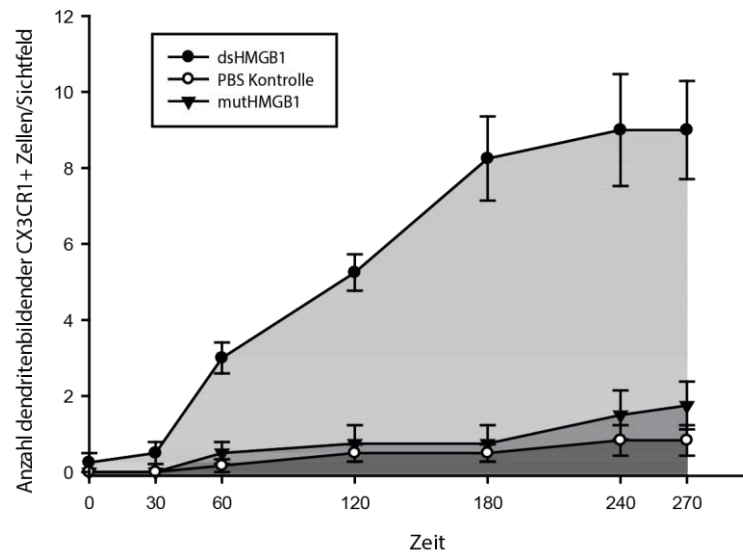


Abbildung 34: Darstellung des Einflusses von HMGB1-Redoxformen auf die Ausbildung von Zellausläufern der gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen

In diesem Graphen ist die unterschiedliche Beeinflussung der Dendritenbildung durch mutHMGB1 und dsHMGB1 gegenüber der Kontrollgruppe mit PBS über die Zeit aufgetragen. Auf der y-Achse ist die Anzahl dendritenbildender gewebsständiger CX₃CR1⁺-Zellen pro Sichtfeld aufgetragen. Die x-Achse gibt die Zeitpunkte über eine Dauer von sechs Stunden wieder. Das Symbol ● steht für die dsHMGB1 Gruppe und das Symbol ▼ weist die Gruppe aus, die mit mutHMGB1 behandelt wurde. Die mit ○ markierten Punkte dagegen repräsentieren die Kontrollgruppe mit PBS. Die grau eingefärbten Flächen beschreiben die AUC. Es ist zu sehen, dass die mit dsHMGB1 behandelte Gruppe eine größere Anzahl dendritenbildender Zellen aufweist als die die mit mutHMGB1 behandelte Gruppe und die Kontrollgruppe. Das Sichtfeld der ausgezählten Zellen beträgt 588 µm x 588 µm. Die jeweilige Größe der Gruppe mit dsHMGB1 und mutHMGB1 beträgt n = 4; für die Untersuchung mit PBS (als Kontrollgruppe) wurden n = 6 Tiere herangezogen.

Die Abb. 34 stellt die AUC der zwei verschiedenen HMGB1-Redoxformen mutHMGB1 und dsHMGB1 der Kontrollgruppe mit PBS gegenüber: In der mit dsHMGB1 behandelten Gruppe konnte bereits nach 30 min die Bildung von Zellausläufern durch gewebsständige CX₃CR1⁺-Zellen beobachtet werden. Vom Zeitpunkt 180 min bis zum Ende der Untersuchung nach 270 min stieg diese auf ein Plateau von ca. 35 Prozent an. Wird diese Gruppe mit der PBS Kontrollgruppe verglichen, so ist durch einen p-Wert von p < 0,001 ein signifikanter Unterschied festzustellen (siehe Tabelle 15).

Zwischen der dsHMGB1 Gruppe und der mutHMGB1 Gruppe war ebenfalls eine Signifikanz gegeben: Die mit mutHMGB1 behandelten Tiere wiesen signifikant weniger dendritenbildende gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen auf als die Gruppe, die mit dsHMGB1 behandelt wurde (siehe Tabelle 16).

Vergleicht man die mutHMGB1-Gruppe mit der PBS-Kontrolle, so ist zu sehen, dass die mit mutHMGB1 behandelte Gruppe zum Zeitpunkt 270 min ein Maximum an dendritenbildenden Zellen aufwies. Dagegen waren in der Kontrollgruppe mit PBS nie mehr als drei Prozent dendritenbildende Zellen zu zählen. Der nicht signifikante Unterschied dieser beiden Gruppen wird durch einen p-Wert von $p > 0,05$ untermauert.

Tabelle 16: Statistische Auswertung der HMGB1-Redoxformen gegenüber der Kontrollgruppe mit PBS

dendritenbildende gewebsständige CX ₃ CR1 ⁺ - Zellen	Zellzahl über die Zeit/Sichtfeld		
	PBS Kontrolle	mutHMGB1	dsHMGB1
AUC	142,5 +/- (162,04)	255 +/- (234,63)	1773,75 +/- (434,47)
dsHMGB1 vs PBS Kontrolle	<0,001**		
dsHMGB1 vs mutHMGB1	<0,001**		
mutHMGB1 vs PBS Kontrolle	1		

** durch ANOVA ermittelte signifikante p-Werte

Abschließend ist aufzuführen, dass die Dendritenbildung der CX₃CR1⁺-Zellen durch oxidiertes HMGB1 ausgelöst wird, während reduziertes HMGB1 keinen Effekt hatte.

6. Herkunft der gewebsständigen CX₃CR1⁺ - Zellen

Nachdem die Mechanismen der Dendritenbildung in den vorangegangenen Kapiteln geklärt wurden, erfolgte als nächstes die Untersuchung der Herkunft der gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen.

Dafür wurden in diesem Teil der Untersuchung zwei Gruppen verschiedener Knochenmarkchimären erstellt: In der ersten Gruppe wurde das Knochenmark von C57BL6/J (Wildtyp-)-Spendertieren in CX₃CR1GFP-Tiere injiziert und nach acht Wochen das Ohrgewebe mit dem 2-Photonen-Mikroskop auf gewebsständige CX₃CR1⁺-Zelle untersucht. Die zweite Gruppe mit C57BL6/J-Empfängertieren erhielt Knochenmark von CX₃CR1GFP-Tieren und wurde ebenfalls im gleichen Abstand intravitalmikroskopisch ausgewertet.

Zuerst sollen die Ergebnisse der CX₃CR1GFP-Tiere aufgeführt werden, denen Wiltyp-Knochenmark transplantiert wurden:

Trotz der Transplantation von C57BL/6J Knochenmark in CX₃CR1GFP-Empfängertiere waren nach acht Wochen immer noch dendritenbildende CX₃CR1⁺-Zellen im Gewebe vorhanden. In Abb. 35 ist exemplarisch die Auswertung acht Wochen nach der Transplantation anhand einer Übersichtsaufnahme zu sehen. In fünf von fünf Tieren konnten gewebständige CX₃CR1⁺-Zellen gezählt werden, die immer noch die Fähigkeit zur Ausbildung von Zellausläufern im Zusammenhang mit einer sterilen Entzündung besaßen.

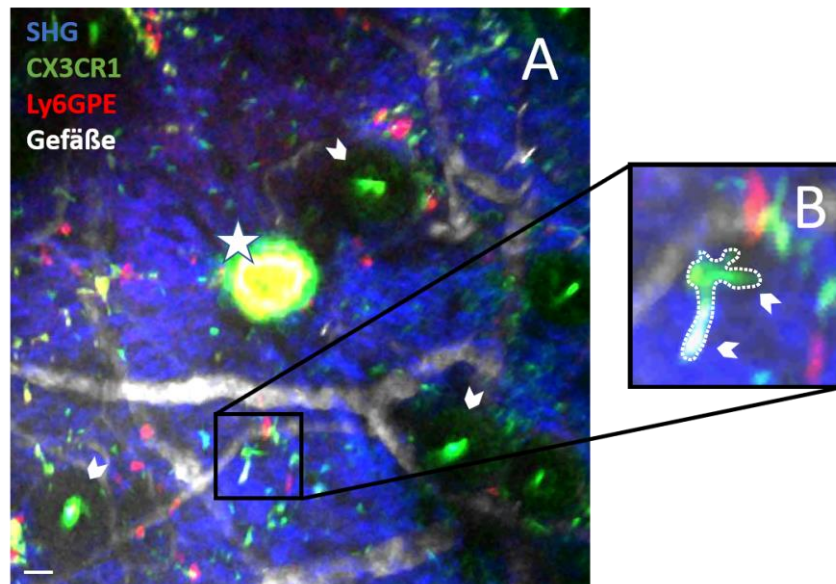


Abbildung 35: Aufnahme acht Wochen nach Transplantation von C57BL/6J-Knochenmark in CX₃CR1-Empfängertiere

Aufnahme einer exemplarischen Chimäre mit dem 2-Photonen-Mikroskop. Trotz der Transplantation von C57BL/6J-Knochenmark in CX₃CR1GFP-Empfängertiere waren nach acht Wochen immer noch dendritenbildende CX₃CR1⁺-Zellen im Gewebe vorhanden. In Weiß sind die Gefäße dargestellt, Grün steht für die CX₃CR1⁺-Zellen; die Neutrophilen sind in der Farbe rot angefärbt. Durch das SHG Signal stellt sich das umliegende Gewebe in Blau dar. Die autofluoreszierenden Haarfollikel sind mit weißen Pfeilspitzen gekennzeichnet. Die Laserverletzung wurde ca.200min vor dieser Aufnahme mit dem 2-Photonen-Mikroskop gesetzt und ist mit einem weißen Sternchen gekennzeichnet. Das Sichtfeld beträgt 588 µm x 588 µm. Der Maßstabsbalken gibt eine Länge von 50 µm an. **A:** In dieser *in vivo*-Aufnahme ist zu erkennen, dass acht Wochen nach der Transplantation immer noch dendritenbildende immobile CX₃CR1⁺-Zellen im Gewebe vorhanden sind. Kleine weiße Pfeilspitzen markieren die Position der Haarfollikel. **B:** Vergrößerung eines Bildausschnittes aus Bild A - hier ist eine gewebständige CX₃CR1⁺-Zelle mit Dendritenbildung zu sehen. Die kleinen weißen Pfeilspitzen markieren die Zellausläufer dieser Zelle.

Umgekehrt wurden in einem weiteren Experiment nach der Bestrahlung von C57BL/6J-Empfängertieren, der Transfer isolierter Knochenmarkszellen von CX₃CR1GFP-Spendertieren durch eine i.v.-Injektion vorgenommen. Die Auswertung dieser Gruppe erfolgte acht Wochen später ebenfalls im Ohrmodell.

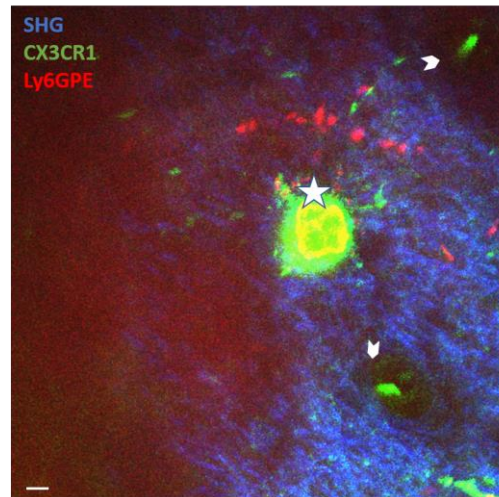


Abbildung 36: Aufnahme acht Wochen nach Transplantation von CX₃CR1GFP-Knochenmark in C57BL/6J-Empfängertiere

In dieser *in vivo*-Aufnahme mit dem 2-Photonen-Mikroskop stellen sich CX₃CR1⁺-Zellen in Grün dar, Ly6GPE⁺ Zellen erscheinen in Rot – das SHG Signal ist in Blau zu sehen. Ein weißer Stern weist auf die Laserverletzung hin, die ca. 200 min zuvor im Gewebe gesetzt wurde. Kleine weiße Pfeilspitzen markieren die autofluoreszierenden Haarfollikel. Nach acht Wochen waren durch die Transplantation von CX₃CR1GFP-Knochenmark in C57BL/6J-Empfängertiere keine dendritenbildenden CX₃CR1⁺-Zellen mehr im Gewebe vorhanden. Das Sichtfeld beträgt 588 µm x 588 µm. Der Maßstabsbalken gibt eine Länge von 50 µm an.

Wie exemplarisch in der obenstehenden Abb. 36 visualisiert, waren in nur zwei von sechs transplantierten C57BL/6J-Tieren gewebständige CX₃CR1⁺-Zellen zu sehen.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass gewebständige CX₃CR1⁺-Zellen bestrahlungsresistent sind und möglicherweise langsam durch Zellen aus dem Knochenmark ersetzt werden können.

7. Charakterisierung der gewebständigen CX₃CR1⁺ - Zellen in der sterilen Inflammation *ex vivo*

Durch immunhistologische Färbungen wurden in diesem Abschnitt der Arbeit die Oberflächenmarker dendritenbildender gewebständiger CX₃CR1⁺-Zellen *in situ* charakterisiert. Dazu wurde ein Whole Mount Staining entwickelt, um den zellulären Kontext und die physiologische Struktur des murinen Ohrgewebes zu erhalten. Wie bereits in der aktuellen Publikation von Gordon et al. beschrieben, lassen sich gewebständige Makrophagen unter anderem mit Hilfe der etablierten Oberflächenrezeptoren F4/80 [179] und CD68 [185] spezifizieren [154]. Dendritische Zellen lassen sich über den Rezeptor CD11c markieren [209, 216].

Durch die Antikörper gegen F4/80 und CD11c wurden Makrophagen und dendritische Zellen im Ohrgewebe charakterisiert. Das im Zytosol befindliche, endogene GFP Signal der CX₃CR1⁺-Zellen blieb erhalten und konnte ebenfalls detektiert werden. Durch eine anschließende Kernfärbung wurde die Lokalisation dieser Zellen verifiziert.

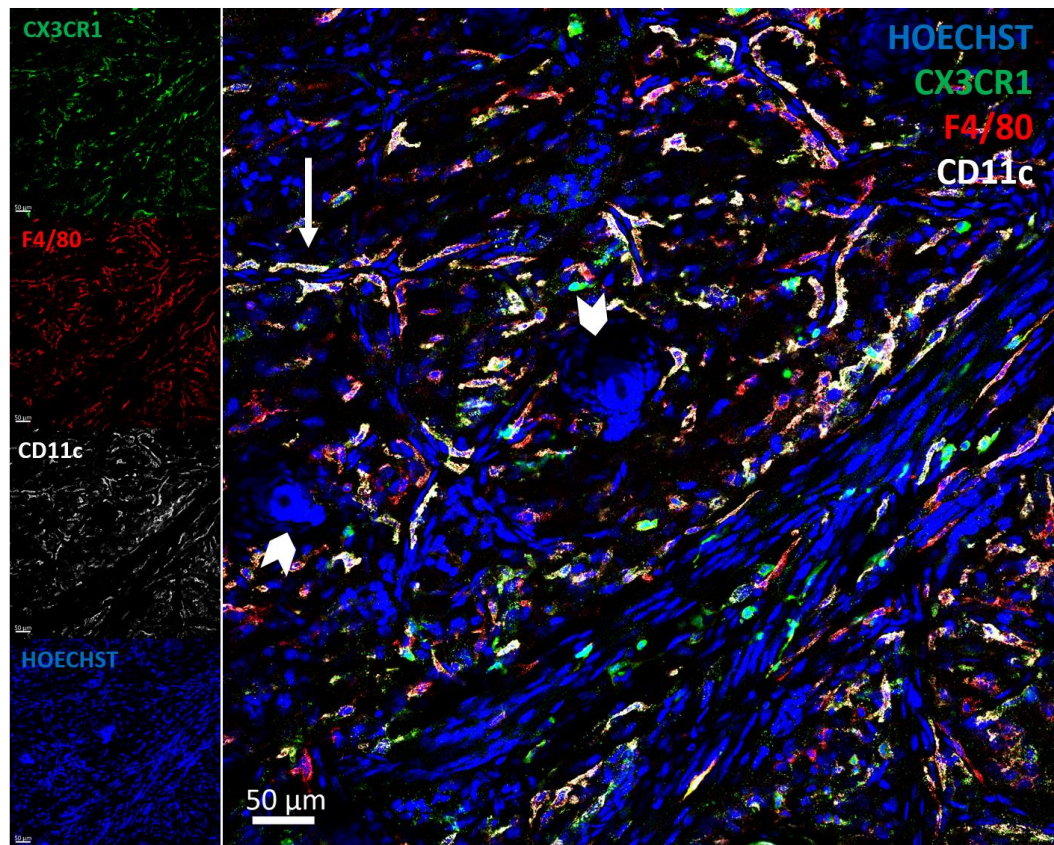


Abbildung 37: Konfokale Übersichtsaufnahme des dermalen Whole Mount Stainings ohne Laserverletzung

Immunhistologische Färbung mit HOECHST (Zellkernfärbung, hier in Blau), F4/80 (rot) und CD11c (weiß). In dieser Übersichtsaufnahme im Ruhezustand sind viele CX₃CR1⁺, F4/80⁺ und CD11c⁺ Zellen zu sehen. Durch die Färbung lässt sich auch die perivaskuläre Position der angefärbten Zellen darstellen (siehe weißer Pfeil mit Schaft). Weiße Pfeilspitzen markieren die Position der Haarfollikel im Gewebe. Die Größe des Sichtfeldes beträgt 607,28 µm x 607,28 µm. Der Maßstabsbalken gibt eine Länge von 50 µm an.

In dieser Färbung in Abb. 37 ohne Gewebeschaden konnten gewebständige CX₃CR1⁺-Zellen detektiert werden. Es zeigte sich, dass sich gewebständige CX₃CR1⁺-Zellen sowohl als F4/80⁺ als auch CD11c⁺ darstellen und darüber hinaus in manchen Fällen auch zur selben Zeit F4/80 und CD11c exprimieren.

Im nächsten Schritt wurde die Dendritenbildung der gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen durch eine Laserverletzung des Gewebes stimuliert und die immunhistologische Färbung mit den oben genannten Antikörpern durchgeführt: In Abb. 38 ist eine konfokale Übersichtsaufnahme der Dermis mit angefärbten dendritenbildenden gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen nach Setzen der Laserverletzung zu sehen.

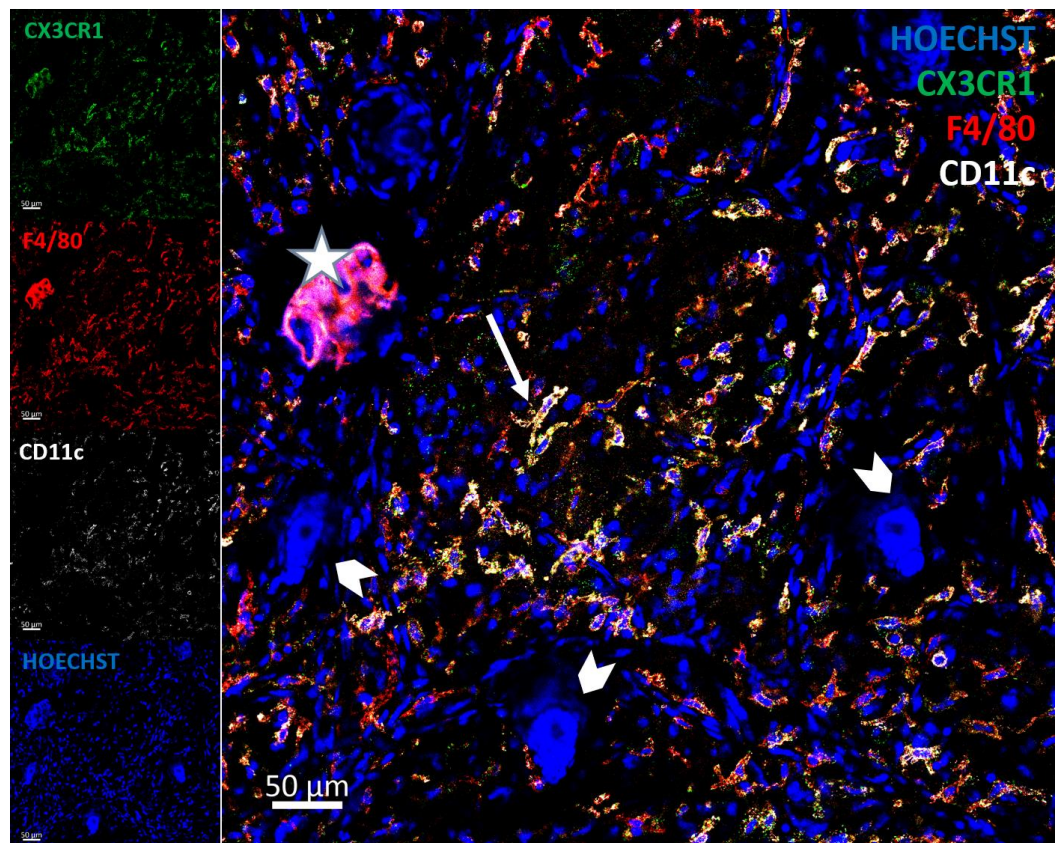


Abbildung 38: Konfokale Übersichtsaufnahme des dermalen Whole Mount Stainings mit Laserverletzung

Immunhistologische Färbung mit HOECHST (Zellkernfärbung, hier in blau), F4/80 (rot) und CD11c (weiß). In dieser Übersichtsaufnahme mit Laserverletzung sind viele CX₃CR1⁺, F4/80⁺ und CD11c⁺ Zellen zu sehen. Die autofluoreszierende Laserverletzung ist mit einem weißen Sternchen markiert. Der weiße Pfeil mit Schaft zeigt auf eine dendritenbildende CX₃CR1⁺/F4/80⁺/CD11c⁺ Zelle in der Nähe der Laserverletzung. Kleine weiße Pfeilspitzen markieren die Position der Haarfollikel. Die Größe des Bildes beträgt 607,28 μm x 607,28 μm. Der Maßstabsbalken gibt eine Länge von 50 μm an.

Um die Verletzung herum lagen CX₃CR1⁺-, F4/80⁺- und CD11c⁺-Zellen zwischen den Haarfollikeln im dermalen Gewebe verteilt. Wie in der Aufnahme unter Ruhebedingung in Abb. 37 färbten sich die gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen in unterschiedlichen Kombinationen mit F4/80 und CD11c an.

Diese Inhomogenität wird noch deutlicher in der untenstehenden Abb. 39: Die Aufnahme zeigt die Expression von F4/80 und CD11c mehrerer gewebsständiger CX₃CR1⁺-Zellen in einem Gewebsabschnitt unter Bedingung einer sterilen Entzündung. Hier ist sowohl deren teilweise perivaskuläre Lage als auch deren Dendritenbildung zu erkennen.

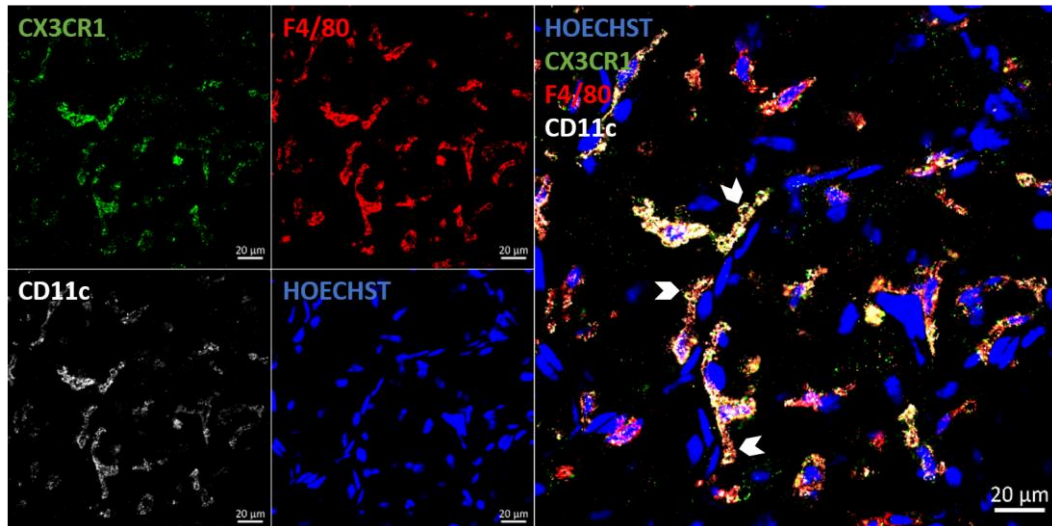


Abbildung 39: Konfokale Großaufnahme mehrerer gewebsständiger CX₃CR1⁺/F4/80⁺/CD11c⁺-Zellen unter Bedingungen einer sterilen Inflammation

Immunhistologische Färbung mit HOECHST (Zellkernfärbung, hier in Blau), F4/80 (rot) und CD11c (weiß). Die ausgeprägte Dendritenbildung der betreffenden Zellen ist durch kleine weiße Pfeilspitzen markiert. Die Größe des Bildes beträgt 210,06 µm x 210,06 µm. Der Maßstabsbalken gibt eine Länge von 20 µm an.

Die immunhistologische Färbung konnte weiterhin zeigen, dass gewebsständige CX₃CR1⁺-Zellen nicht nur doppelt positiv für F4/80 und CD11c waren, sondern auch einzelne CX₃CR1⁺-Zellen nur für den Marker F4/80 positiv waren.

Eine solche Zelle mit ausgeprägter Dendritenbildung ist exemplarisch in Abb. 40 in einer weiteren Aufnahme nach Setzen einer Laserverletzung im umliegenden Gewebe illustriert. Diese Zelle ist F4/80⁺, gleichzeitig aber CD11c⁻.

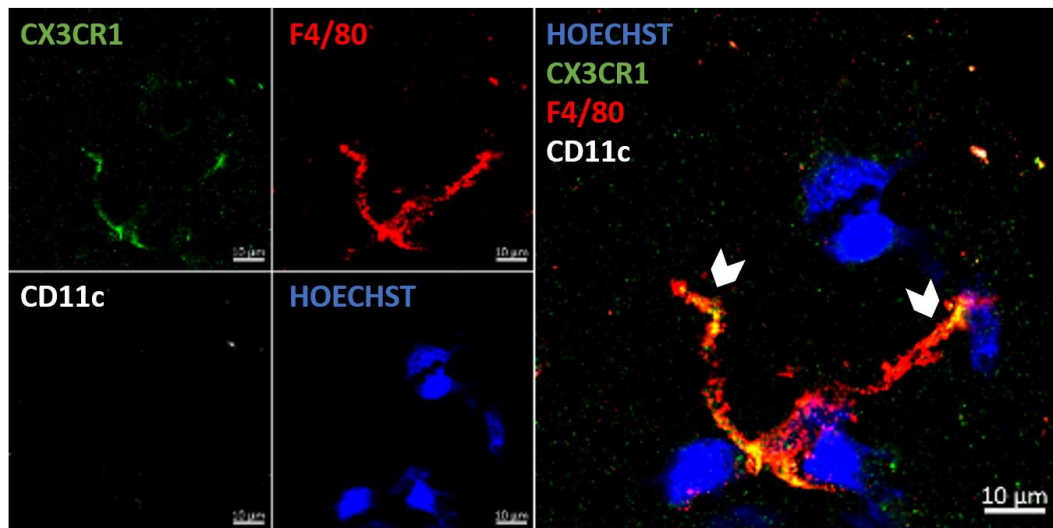


Abbildung 40: Gewebsständige CX₃CR1⁺/F4/80⁺/CD11c⁻ Zelle in der Nähe der Laserverletzung

Immunhistologische Färbung mit HOECHST (Zellkernfärbung, hier in Blau), F4/80 (rot) und CD11c (weiß). Die dargestellte dendritenbildende gewebsständige CX₃CR1⁺-Zelle ist F4/80⁺, gleichzeitig aber CD11c⁻. Kleine weiße Pfeilspitzen weisen auf die ausgeprägte Bildung von Zellausläufern hin. Der linke Zellausläufer kontaktiert eine weitere Zelle (hier dargestellt durch einen Zellkern in Blau). Die Größe des Bildes beträgt 85,5 µm x 85,5 µm. Der Maßstabsbalken gibt eine Länge von 10 µm an.

In der Aufnahme aus Abb. 40 ist die dargestellte CX₃CR1⁺/F4/80⁺/CD11c⁻-Zelle mit zwei ausgeprägten Bildungen von Zellfortsätzen zu sehen. Mit dem linken Zellausläufer kontaktiert sie eine weitere Zelle.

In einer weiterführenden Untersuchung wurden Färbungen mit F4/80 und CD68 angefertigt und in der gleichen Weise mit dem konfokalen Mikroskop ausgewertet; das Ergebnis ist in Abb. 41 zu sehen.

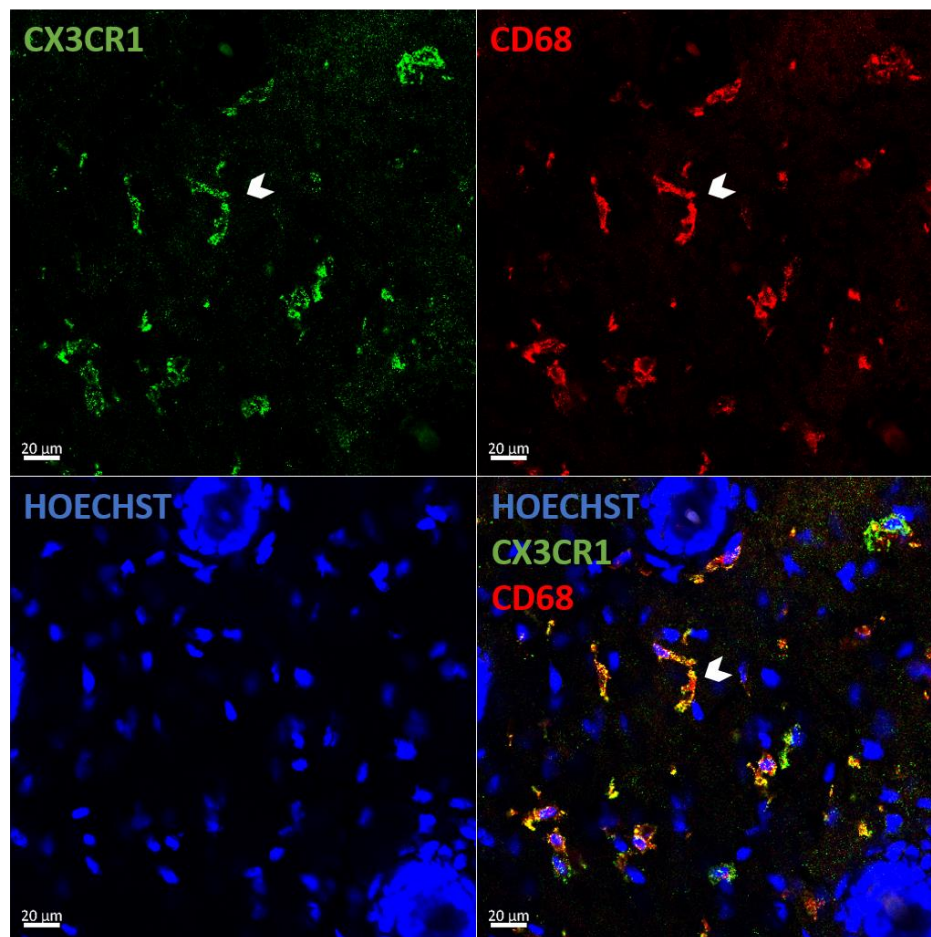


Abbildung 41: Konfokale Aufnahme einer immunhistologischen Färbung mit F4/80 und CD68 nach Induktion eines Laserschadens im angrenzenden Gewebe

Immunhistologische Färbung mit HOECHST (Zellkernfärbung, hier in Blau) und CD68 (rot). Die mit einer kleinen weißen Pfeilspitze gekennzeichnete dendritenbildende gewebtsständige CX₃CR1⁺ Zelle ist F4/80⁺ und CD68⁺. Die Größe des Bildes beträgt 210,06 µm x 210,06 µm. Der Maßstabsbalken gibt eine Länge von 20 µm an.

Wie der Abb. 41 zu entnehmen ist, exprimieren dendritenbildende gewebtsständige CX₃CR1⁺-Zellen unter Bedingung einer sterilen Inflammation ebenfalls den Oberflächenmarker CD68.

Um auszuschließen, dass es sich bei den Färbungen um Autofluoreszenz oder unspezifische Bindungen der Antikörper handelt, wurden korrespondierende Isotyp-Kontrollen angefertigt und mit Hilfe des konfokalen Mikroskops mit exakt gleichen Einstellungen der Referenzwerte ausgewertet. In Abb. 42 und Abb. 43 sind die korrespondierenden Isotyp-Kontrollen für CD11c und F4/80 zu sehen:

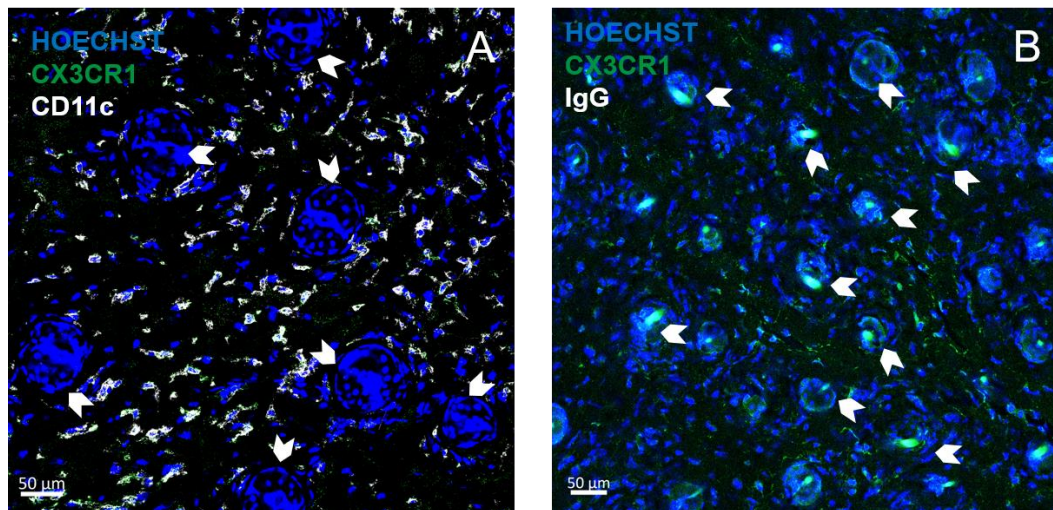


Abbildung 42: Gegenüberstellung der Färbung mit CD11c und der Isotyp-Kontrolle IgG

A: In dieser Färbung wurden Dermal Sheets eines CX₃CR1GFP-Tiers mit HOECHST (blau) und dem primären Antikörper CD11c armenischer Hamster anti Maus und dem sekundären Antikörper Ziege anti armenischer Hamster AF647 (weiß) behandelt. CX₃CR1⁺-Zellen stellen sich in Grün dar. **B:** In dieser Färbung wurden Dermal Sheets eines CX₃CR1GFP-Tiers mit HOECHST (blau) und dem primären Antikörper IgG armenischer Hamster anti Maus und dem sekundären Antikörper Ziege anti armenischer Hamster AF647 (weiß) behandelt. CX₃CR1⁺-Zellen stellen sich in Grün dar. Es ist keine spezifische Zellbindung im Vergleich zur Positivkontrolle aus Bild A zu sehen. Kleine weiße Pfeilspitzen markieren in beiden Bildern die jeweilige Position der Haarfollikel mit autofluoreszierenden Haarstümpfen. Die Größe der Bilder beträgt 700,19 µm x 700,19 µm. Der Maßstabsbalken gibt eine Länge von 50 µm an.

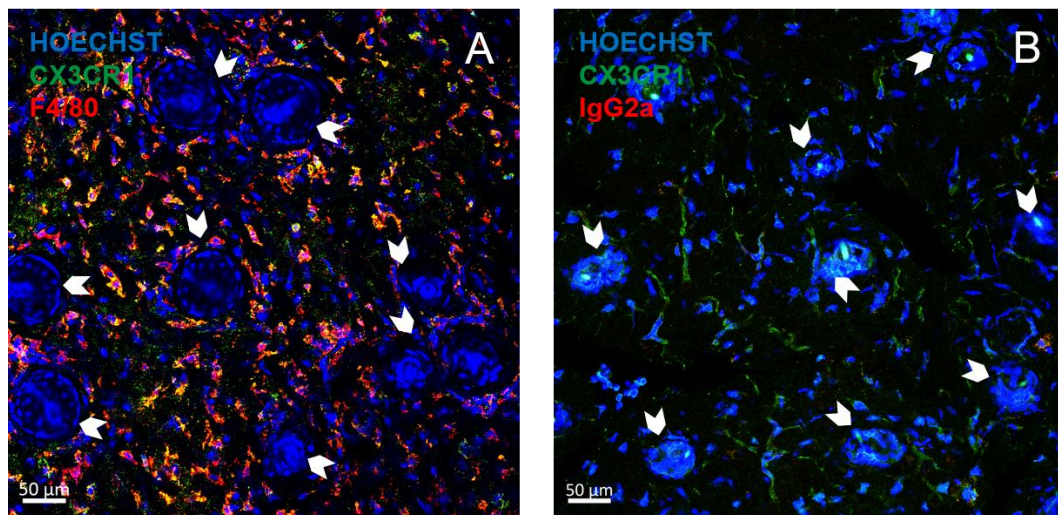


Abbildung 43: Gegenüberstellung der Färbung mit F4/80 und der Isotyp-Kontrolle IgG2a

A: Färbung eines CX₃CR1GFP-Tiers mit HOECHST (blau) und F4/80 (rot). Die Zellen grenzen sich gut von der Umgebung ab. CX₃CR1⁺-Zellen stellen sich in Grün dar. **B:** In dieser Färbung wurden Dermal Sheets eines CX₃CR1GFP-Tiers mit dem primären Antikörper IgG2a Ratte anti Maus und dem sekundären Antikörper Ziege anti Ratte A594 (rot) behandelt. CX₃CR1⁺-Zellen stellen sich in Grün dar. Es ist keine spezifische Zellbindung zu sehen. Kleine weiße Pfeilspitzen markieren in beiden Bildern die jeweilige Position der Haarfollikel mit autofluoreszierenden Haarstümpfen. Die Größe der Bilder beträgt 700,19 µm x 700,19 µm. Der Maßstabsbalken gibt eine Länge von 50 µm an.

Abbildungen 42 und 43 beweisen, dass beide korrespondierenden Isotyp-Kontrollen negativ waren und untermauern dadurch die Spezifität der genutzten Antikörper.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass dendritenbildende gewebständige CX₃CR1⁺-Zellen unter der Bedingung einer sterilen Inflammation keine homogene Zellpopulation bilden und die Oberflächenmarker F4/80, CD11c und CD68 exprimieren können.

Daran anschließend wurde die etablierte und verifizierte Färbung für eine Quantifizierung der verschiedenen Zellpopulationen herangezogen.

7.1. Charakterisierung der verschiedenen gewebständigen Zellpopulationen in der sterilen Inflammation *ex vivo*

Dieser Abschnitt behandelt die Quantifizierung der gewebständigen CX₃CR1⁺, F4/80⁺- und CD11c⁺-Zellen nach Laserverletzung *ex vivo* durch das zuvor etablierte Whole Mount Staining. Dazu wurden die Dermal Sheets einer Gruppe von CX₃CR1GFP-Tieren, in der wie oben beschriebenen Weise, mit den Antikörpern anti-F4/80 und anti-CD11c gefärbt und anschließend durch manuelle Auszählung quantifiziert.

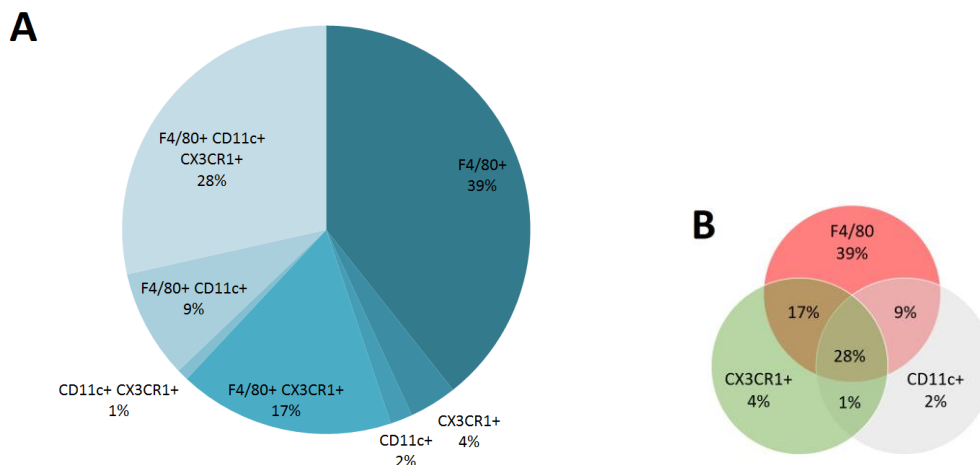


Abbildung 44: Quantifizierung der gewebständigen CX₃CR1⁺, F4/80⁺- und CD11c⁺-Zellen unter Bedingungen der sterilen Inflammation im Whole Mount Staining *ex vivo*

A: In diesem Diagramm sind die verschiedenartigen Zellpopulationen nach ihren Oberflächenrezeptorexpressionen aufgeteilt. Angeführt werden sie von einer F4/80⁺/CX₃CR1⁺/CD11c⁺-Population mit 39 %, gefolgt von 28 % gewebständigen CX₃CR1⁺/F4/80⁺/CD11c⁺-Zellen. Das Schlusslicht bildet die Zellgruppe von gewebständigen CX₃CR1⁺/F4/80⁺/CD11c⁺-Zellen. **B:** Darstellung der Überlappung der verschiedenen Zellpopulationen und ihren Markern. In Grün sind CX₃CR1⁺-Zellen dargestellt, in Rot F4/80⁺-Zellen. In Grau ist die Population von CD11c⁺-Zellen zu erkennen. Die Größe der Gruppe beträgt n = 3.

Dem Diagramm A in Abb. 44 ist zu entnehmen, dass die Zellpopulationen durch eine bemerkenswert große Gruppe von $F4/80^+/CX_3CR1^-/CD11c^-$ -Zellen angeführt wurde (39%), dicht gefolgt von einer großen Zellpopulation von gewebsständigen $CX_3CR1^+/F4/80^+/CD11c^+$ -Zellen mit 28 %. Als nächstes folgten gewebsständige CX_3CR1^+ -Zellen, die zusätzlich den Oberflächenmarker $F4/80^+$ exprimierten (17 %) und $CD11c^-$ waren. Zudem war eine Population von $CX_3CR1^-/F4/80^+/CD11c^+$ -Zellen (9%) nachweisbar.

Das Schlusslicht bildeten mit 4 % einfach CX_3CR1^+ -Zellen gefolgt von 2 % einfach $CD11c^+$ -Zellen. Mit nur 1 % traten die seltenen gewebsständigen CX_3CR1^+ -Zellen auf, die zusätzlich nur $CD11c$ exprimierten.

In diesem Abschnitt der Arbeit konnte gezeigt werden, dass gewebsständige CX_3CR1^+ -Zellen in der sterilen Inflammation eine inhomogene Gruppe sind und sich hinsichtlich ihrer Markerexpression von $F4/80$ und $CD11c$ unterscheiden. Ungefähr ein Drittel aller gezählter Zellen war $CX_3CR1^+/F4/80^+/CD11c^+$.

7.2. Quantifizierung der dendritenbildenden gewebsständigen CX_3CR1^+ - Zellen *ex vivo*

Um explizit die dendritenbildenden gewebsständigen CX_3CR1^+ -Zellen zu charakterisieren, wurden bei einer weiteren Auswertung nur CX_3CR1^+ -Zellen mit Ausbildung von Zellfortsätzen ausgezählt.

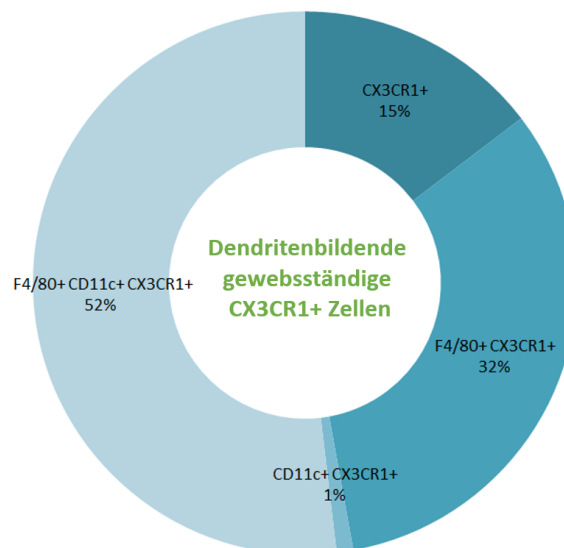


Abbildung 45: Quantifizierung der gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen mit Ausbildung von Zellfortsätzen nach Induktion einer Laserverletzung *ex vivo*

In diesem Ringdiagramm ist zu sehen, dass über die Hälfte der dendritenbildenden gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen sowohl F4/80 als auch CD11c exprimieren. Die Größe der Gruppe beträgt n = 3.

So ist der der Abb. 45 zu entnehmen, dass die Mehrheit der dendritenbildenden gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen sowohl die Oberflächenmarker für F4/80 als auch für CD11c exprimierten (52 %). Auf diese große Population an CX₃CR1⁺/F4/80⁺/CD11c⁺ folgte eine Gruppe ausschließlich CX₃CR1⁺-dendritenbildender Zellen mit 15 %. Daran schließt sich eine CX₃CR1⁺/F4/80⁺/CD11c⁻-Zellfraktion mit 32% an. Ähnlich wie im Diagramm in Abb. 43 nahmen dendritenbildende gewebsständige CX₃CR1⁺-Zellen, die sich zusätzlich mit anti-CD11c anfärben ließen, die am wenigsten vertretene Zellpopulation mit 1 % ein.

Zusammenfassend konnte eine leitende Zellpopulation von gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen mit Bildung von Zellausläufern herausgearbeitet werden, die überwiegend die Oberflächenmarker F4/80 und CD11c aufweist. Gewebsständige CX₃CR1⁺-Zellen können also sowohl den Makrophagenmarker F4/80 als auch den dendritischen Zellmarker CD11c exprimieren.

8. Dendritenbildung im Clec9a- Cre; Rosa26- tomato; CX₃CR1GFP- Modell in *vivo*

Da die Charakterisierung der dendritenbildenden gewebständigen CX₃CR1⁺- Zellen gezeigt hat, dass diese Zellen sowohl dendritische Zellmarker als auch Makrophagenmarker exprimieren, wurde das Clec9a-Cre;Rosa26-tomato;CX₃CR1GFP-Mausmodell für *in vivo*-Untersuchungen hinzugezogen. Unter Kontrolle des Clec9a-Promotors (dieser ist spezifisch für dendritische Zellen) stellen sich dendritische Zellen im 2-Photonen-Mikroskop in roter Farbe dar, während weiterhin CX₃CR1⁺-Zellen GFP exprimieren und in Grün erscheinen. Dadurch ist im Gegensatz zur *ex vivo*-Analyse eine dynamische Untersuchung *in vivo* möglich. Wie in den vorangegangenen Experimenten wurde die Videosequenz vor der Laserverletzung erstellt (um die immobilen Zellen zu verifizieren), danach der Gewebsschaden gesetzt, um anschließend das Verhalten dieser Zellen unter Bedingungen einer sterilen Entzündung zu analysieren.

Das Sichtfeld eines Clec9a-Cre;Rosa26-tomato;CX₃CR1GFP-Tieres im Ohrmodell durch das 2-Photonen-Mikroskop nach Setzen einer Laserverletzung ist in der untenstehenden Abb. 46 zu sehen. Im Folgenden werden Clec9a⁺-Zellen als RFP⁺-Zellen aufgeführt und CX₃CR1⁺-Zellen als GFP⁺-Zellen.

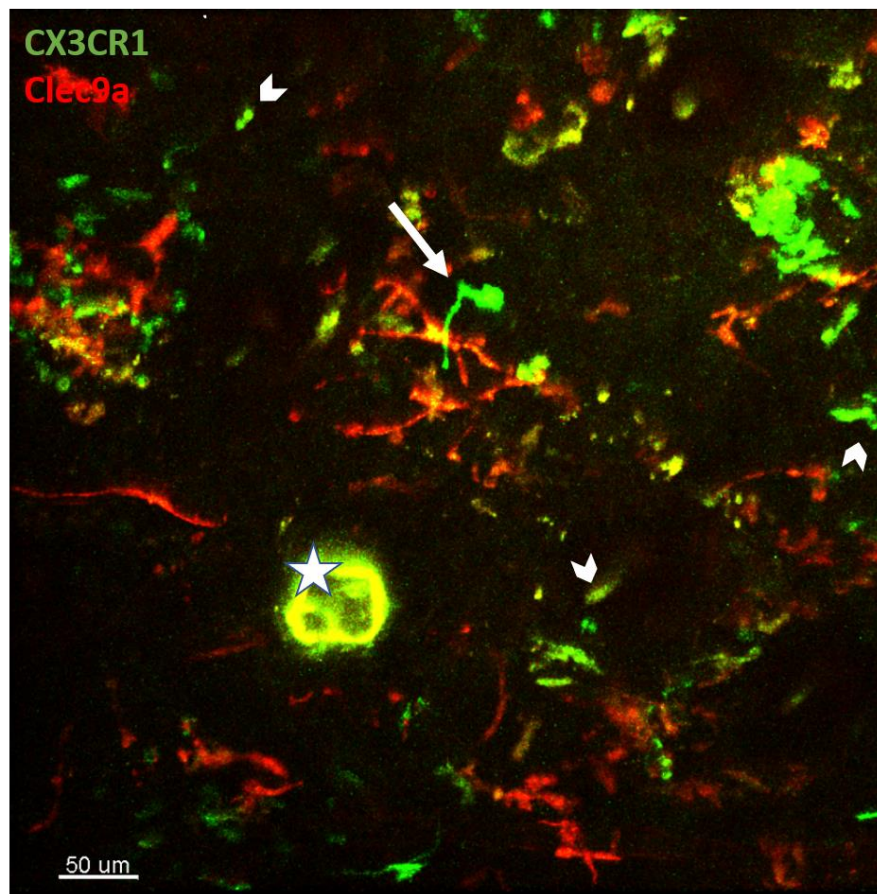


Abbildung 46: Sichtfeld im Clec9a-Cre;Rosa26-tomato;CX₃CR1GFP-Modell mit Laserverletzung

In dieser *in vivo*-Aufnahme einer Clec9a-Cre;Rosa26-tomato;CX₃CR1GFP-Maus wurde vor ca. 180 min eine Laserverletzung gesetzt (der autofluoreszierende Gewebeschaden ist in dieser Abb. mit einem Sternchen markiert). Clec9a⁺-Zellen sind mit einem roten fluoreszierenden Protein (RFP) in Rot sichtbar, während CX₃CR1⁺-Zellen das grün fluoreszierende Protein (GFP) exprimieren und sich in grüner Farbe darstellen. Der weiße Pfeil mit Schaft markiert eine exemplarische CX₃CR1⁺-Zelle, die ca. fünf Stunden nach Setzen der Laserverletzung einen Zellfortsatz in Richtung des Entzündungsherdes ausbildet. Kleine weiße Pfeilspitzen markieren die Position von Haarfollikeln. Das Sichtfeld beträgt 588 μm x 588 μm. Der Maßstabsbalken gibt eine Länge von 50 μm an.

Um die verschiedenen Zellpopulationen innerhalb der Gruppe der gewebständigen immobilen Zellen zu quantifizieren, wurde Videomaterial über ca. sieben Stunden angefertigt und mittels des Software-Programms Imaris ausgewertet. Dazu wurden drei Subpopulationen an gewebständigen immobilen GFP⁺/RFP⁻ bzw. GFP⁻/RFP⁺-Zellen und die doppelt positive GFP⁺/RFP⁺-Zellpopulation ausgezählt, indem die Aufnahmen vor der Laserverletzung mit denen danach verglichen wurden.

In der untenstehenden Graphik in Abb. 47 ist eine Gegenüberstellung der Auswertung der Dendritenbildung der verschiedenen, zuvor aufgeführten, Zellpopulationen zu sehen:

Von insgesamt 16 GFP/RFP⁺-Zellen haben durchschnittlich 25 % Dendriten ausgebildet, während von 12 GFP⁺/RFP⁻-Zellen 75 % (9 Zellen) eine Dendritenbildung nach der Induktion des Gewebeschadens zeigten. Die Gruppe der RFP⁺/GFP⁺-Zellen war die am geringsten vertretene Zellpopulation mit insgesamt 11 gezählten Zellen; davon zeigten aber nur ca. 18 % der Zellen eine Dendritenbildung unter Einfluss einer sterilen Inflammation.

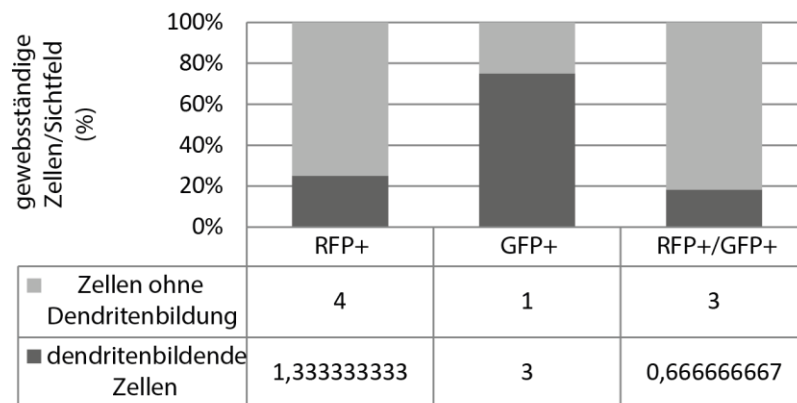


Abbildung 47: Dendritenbildung im Clec9a-Cre;Rosa26-tomato;CX₃CR1GFP-Mausmodell

Prozentuale Darstellung der dendritenbildenden GFP⁻/RFP⁺-, GFP⁺/RFP⁻ und GFP⁺/RFP⁺-Zellpopulationen unter Bedingungen der sterilen Inflammation. GFP⁺ Zellen sind CX₃CR1⁺-Zellen und RFP⁺-Zellen stehen für Clec9a⁺-Zellen. Die GFP⁺/RFP⁻-Zellpopulation zeigt eine um 50 % höhere Anzahl dendritenbildender Zellen, als die GFP⁺/RFP⁺-Gruppe und eine um ca. 57 % gesteigerte Dendritenbildung gegenüber der GFP⁻/RFP⁺-Zellpopulation. Das Sichtfeld der ausgezählten Zellen beträgt 588 µm x 588 µm. Die Gruppengröße beträgt n = 3

In Abb. 48 ist die Bildung eines Zellfortsatzes einer GFP⁺/RFP⁻-Zelle exemplarisch illustriert; die Aufnahmen sind ca. fünf Stunden nach Induktion der Laserverletzung entstanden. Sichtbar ist zum Zeitpunkt 0 die elliptische Form der Zelle, umgeben von GFP⁻/RFP⁺-, GFP⁺/RFP⁻ und GFP⁺/RFP⁺-Zellen. Über einen Zeitraum von ca. 30 min. ist den Bildern zu entnehmen, wie diese Zelle zwei Zellausläufer ausbildet.

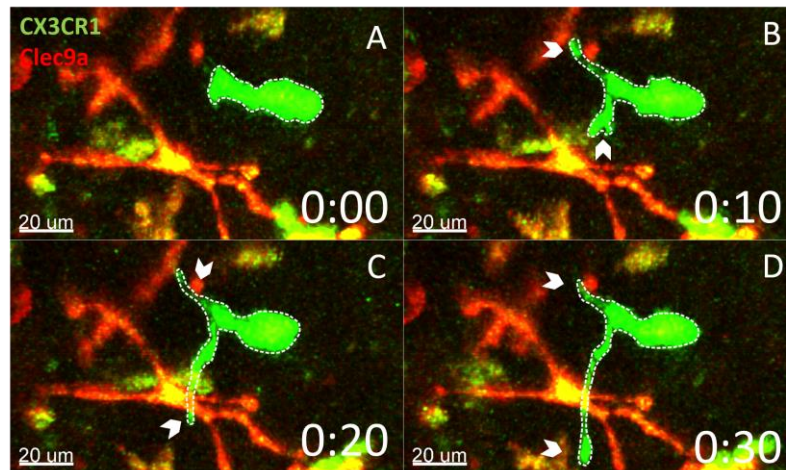


Abbildung 48: Exemplarische Ausbildung von Zellfortsätzen einer CX₃CR1⁺-Zelle im Clec9a-Cre;Rosa26-tomato;CX₃CR1GFP-Mausmodell

Die Zellfortsatzbildung im Clec9a-Cre;Rosa26-tomato;CX₃CR1GFP-Mausmodell findet in diesem Beispiel über einen Zeitraum von ca. 30 min statt. CX₃CR1⁺-Zellen fluoreszieren in Grün, Clec9a⁺- Zellen stellen sich in Rot dar. Die Aufnahmen sind ca. fünf Stunden nach Setzen der Laserverletzung entstanden. Der Maßstabsbalken gibt eine Länge von 20 µm an. **A:** Zum Zeitpunkt 0 sind keine Dendriten zu sehen; die Zelle erscheint in einer ellipsoiden Gestalt. **B:** Nach 10 min bilden sich zwei Zellfortsätze aus, die in diesem Bild mit kleinen weißen Pfeilen markiert sind. **C:** Zum Zeitpunkt von 20 min verlängern sich die Zellfortsätze und der Aktionsradius der Zelle vergrößert sich. Zwei weiße Pfeilspitzen weisen darauf hin. **D:** Weitere 10 min später ist deutlich zu sehen, dass sich die Zellfortsätze nochmals verlängert haben. Die weißen Pfeile markieren nun die Position der Dendriten nach einer Zeit von 30 min.

Durch das Clec9a-Cre;Rosa26-tomato;CX₃CR1GFP-Mausmodell konnte somit bestätigt werden, dass auch hier die gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen die Fähigkeit besitzen, unter Einfluss einer sterilen Entzündung Zellfortsätze auszubilden. Hierbei handelt es sich somit um Makrophagen und nicht um dendritische Zellen.

VI. DISKUSSION

1. Wahl der Tierstämme

Die Wahl des Versuchstiers Maus begründet sich auf der diversen Auswahl an transgenen Stämmen, die passend zum experimentellen Setting und der initialen Theorie ausgewählt werden können. Hilfreich ist auch die zeitsparende Züchtung durch den schnellen Generationswechsel, die unkomplizierte Haltung und das leicht zu erlernende Handling dieser Tiere. In dieser Arbeit wurden zwei transgene Mausstämme für die *in vivo*-2-Photonen-Mikroskopie, die Knochenmarktransplantation und *ex vivo* für immunhistologischen Fluoreszenzfärbungen herangezogen:

Die von Jung et al. [112] generierten CX₃CR1GFP (Fraktalkine-Rezeptor) -Tiere wurden für *in vivo*- und *ex vivo*-Untersuchungen der Interaktion von gewebständigen CX₃CR1⁺-Zellen mit neutrophilen Granulozyten verwendet. Für die immunhistochemischen Fluoreszenzfärbungen zur Charakterisierung der gewebständigen dendritenbildenden CX₃CR1⁺-Zellen wurde ebenfalls auf diese Linie zurückgegriffen. Neben der größten Zellpopulation der Makrophagen exprimieren auch ein Teil der Monozyten, Subpopulationen von NK-Zellen und dendritischen Zellen, Neuronen, Mikroglia und aktivierte Endothelzellen das GFP [112].

Schraml et al. [215] konnten 2013 in einem weiteren transgenen Mausmodell Clec9a-Cre den für dendritische Zellen spezifischen Rezeptor DNNGR-1 (Clec9a) markieren. So konnten Vorläufer von konventionellen DCs (cDCs) durch die Expression des DNNGR-1-Rezeptors analysiert und von anderen Leukozytenpopulationen abgegrenzt werden. Genetische Verfolgungen des DNNGR-1-Gens haben gezeigt, dass spezifisch die Zellen markiert werden, die traditionell der DC-Linie zugeschrieben sind. In einigen Geweben werden somit auch Monozyten und Makrophagen als Abkömmlinge von DC-Vorläuferzellen detektierbar [215]. Durch die Verpaarung mit dem CX₃CR1GFP-Mausstamm entstand das Mausmodell Clec9a-Cre;Rosa26-tomato;CX₃CR1GFP, mit dem die Möglichkeit gegeben war, das Verhalten endogen markierter Makrophagen und dendritischer Zellen *in vivo* zu analysieren.

2. Das Ohrmodell im 2-Photonen-Mikroskop

Für die Visualisierung der sterilen Entzündung und des Zusammenspiels der verschiedenen Immunzellpopulationen musste ein geeignetes Modell gefunden werden, welches einfach in der Präparation und Darstellung der Mikrozirkulation und stabil genug für intravitalmikroskopische Aufnahmen über einen längeren Zeitraum ist. Die Präparation des *Musculus Cremaster* erfordert viel Übung und stellt eine invasive Methode dar. Es ist nur die Verwendung von männlichen Mäusen möglich; dadurch entsteht ein Zuchtüberschuss. Bereits durch die Darstellung des Muskels und das Aufspannen und Feststecken des dünnen Häutchens, wird eine Entzündungsreaktion hervorgerufen [229]. Auch die thermische Verletzung der Leber sowie die Pankreasentzündung kommen als *in vivo*-Modelle der sterilen Inflammation nicht in Frage, da es durch Präparation und Manipulation der Organe zu Beeinträchtigungen der Ergebnisse kommen kann. Durch die Lage in der Bauchhöhle müssen die Organe zuerst durch Laparotomie der Peritonealhöhle entnommen werden, um dann durch Halterungen in Position gehalten werden. Es handelt sich hier um invasive Eingriffe, die die Überlebensdauer des Tieres in Narkose verringert.

Die minimalinvasive Präparation des Ohrmodells begründet sich auf der leichten Zugänglichkeit des Ohrs: Durch feine Nadeln wird das Gewebe auf der Stage gespannt und festgesteckt. Die Stelle für die intravitalmikroskopischen Aufnahmen wird in einer Distanz zu den Nadeleinstichen in unversehrtem Gewebe durchgeführt. Darüber hinaus werden die Aufnahmen wenig von respiratorischen Bewegungen gestört. Das Modell ist durch Übung gut zu erlernen und kann durch die nicht-invasive Präparation für Aufnahmen je nach Stabilität der Narkose von bis zu sieben Stunden verwendet werden. Im Vergleich zum Cremaster-Modell können Tiere beider Geschlechter verwendet werden. Durch einen fokussierten Laserstrahl erfolgt die Schaffung einer lokalen Gewebse Nekrose. Auf diese Weise ist es möglich das interstitiellen Migrationsverhalten verschiedener Leukozytenpopulationen zu analysieren.

Ebenfalls eignet sich das Ohrgewebe nach der Entfernung der Epidermis für Whole Mount Stainings: Die zuvor gesetzten Laserverletzungen waren selbst nach der Behandlung mit Fixationsmitteln, Blocklösungen und Antikörpern sichtbar und eine Charakterisierung der dendritenbildenden gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen konnte so vorgenommen werden.

3. Diskussion der Ergebnisse

3.1. Gewebsständige CX₃CR1⁺-Zellen und die Interaktion mit neutrophilen Granulozyten in der sterilen Entzündung

In den Untersuchungen der hier vorliegenden Arbeit konnte eine morphologische Veränderung der Gestalt der gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen unter Einfluss einer sterilen Entzündung beobachtet werden. Gewebsständige CX₃CR1⁺-Zellen wiesen hierbei eine ausgeprägte Bildung von Zellausläufern auf. Diese Dendritenbildung ereignete sich im Durchschnitt drei Stunden nach Setzen der Laserverletzung.

Eine ähnliche Beobachtung beschrieben bereits Abtin et al. [120], die bei einer Untergruppe von perivaskulär gelegenen Makrophagen in der Umgebung von postkapillären Venolen verlängerte Zellfortsätze und eine dendritische Gestalt in einer bakteriellen Infektion der Haut feststellten. In der hier vorliegenden Arbeit konnten so nicht nur die dendritische Gestalt der perivaskulär gelegenen Makrophagen beschrieben werden, sondern darüber hinaus auch die Bildung von Zellausläufern der im Gewebe liegenden, immobilten Makrophagen belegt werden. Durch *in vivo*-Langzeitvideoaufnahmen wurde der vollständige Prozess der Zellausläuferbildung unter Einfluss einer sterilen Entzündung visualisiert.

Weiterführend konnten Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Dendritenbildung ohne den Stimulus einer Entzündung, nicht erfolgen konnte. Damit konnte eine direkte Abhängigkeit der Dendritenbildung vom Stimulus einer sterilen Entzündung bewiesen werden, wie sie in der Literatur bisher in diesem Zusammenhang nicht beschrieben wurde.

Im weiteren Verlauf wurde näher untersucht, welche Funktion die Bildung von Zellfortsätzen im Zusammenhang der sterilen Inflammation aufwies und ob Makrophagen mit Zellausläufern mit anderen Immunzellpopulationen interagieren.

Die Ergebnisse zeigten, dass neutrophile Granulozyten mit dendritenbildenden Makrophagen Kontakt aufnehmen und diesen über einen bestimmten Zeitraum beibehalten. Der interzelluläre Austausch von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten sowie deren Interaktion in der Bekämpfung des Ausmaßes einer Entzündung waren bereits in der Vergangenheit Gegenstand von Untersuchungen anderer Gruppen.

So zeigten Abtin et al., dass Neutrophile bevorzugt an Gefäßstellen austraten, in deren Nähe perivaskuläre dendritenbildende Makrophagen zu finden waren [120]. Durch die Untersuchungen der hier vorliegenden Arbeit wurden migrierende Neutrophile beobachtet, die nach Kontakt mit einem der Zellausläufer ihre Richtung änderten. Die hier gewonnenen Ergebnisse könnten im Zusammenhang mit publizierten Ergebnissen von Wang et al. stehen. Diese postulieren, dass neutrophile Granulozyten, die durch den Einfluss einer sterilen Entzündung ins Gewebe rekrutiert wurden, nicht am Ort der Entzündung zu Grunde gehen. Die meisten Neutrophilen sollen so den Ort der Entzündung verlassen, um eine erfolgreiche Auflösung der Entzündung gewährleisten zu können [144]. Dies entspricht den hier in der Arbeit beschriebenen Ergebnissen: Nach Setzen des Laserschadens vergingen im Durchschnitt drei Stunden bis zum Auftreten der Ausbildung von Zellfortsätzen; trat ein Neutrophiler mit einem Teil des Dendriten in Kontakt, migrierte diese Zelle in die der Gewebsverletzung entgegengesetzte Richtung. Ohne vorherigen Kontakt mit Makrophagen setzten die Neutrophilen ihren Weg ungehemmt zum Ort der Entzündung fort. Eine Untermauerung dieser Interaktion stellten die signifikant geringere Migrationsgeschwindigkeit und Verlagerungsdistanz im Gewebe, gegenüber der Gruppe ohne Interaktion mit Makrophagen, dar. Damit besteht die Annahme, dass dendritenbildende gewebsständige CX₃CR1⁺-Makrophagen, durch ihren Einfluss auf neutrophile Granulozyten, als ein inhibierender Faktor der sterilen Entzündung angesehen werden können.

Die Phagozytose von neutrophilen Granulozyten durch Makrophagen initiiert die Deaktivierung und die Expression von antiinflammatorischen Mediatoren und Wachstumsfaktoren und aktiviert so die Heilungsprozesse [7, 164-167]. Durch diesen Prozess könnten gewebsständige Makrophagen einige Zeit nach dem Setzen der Laserverletzung, begünstigt durch das antiinflammatorische Milieu, mit der Umlenkung der Neutrophilen zur Auflösung der Entzündung beitragen. Diese Untersuchungsergebnisse decken sich mit weiteren Befunden: Die Aufnahme von apoptotischen Neutrophilen am Ort der Entzündung soll ein antiinflammatorisches Programm einleiten. Die Signale der phagozytierenden Makrophagen stoppen den Neutrophileneinstrom, minimieren so den Gewebeschaden und leiten die Heilung ein [136].

Diese Feststellungen stehen im Kontrast zu Publikationen von De Filippo et al. [207] und Schiwon et al. [208]: Diese sind der Auffassung, dass gewebsständige Makrophagen neutrophile Granulozyten durch Sekretion von Chemokinen zum Ort der Entzündung leiten sollen. In der vorliegenden Arbeit konnte aber gegensätzlich gezeigt werden, dass Makrophagen durch morphologische Veränderung eine antiinflammatorische Rolle im Prozess der sterilen Entzündung einnehmen könnten und Neutrophile davon abhalten, zur Entzündung zu gelangen, um die Symptome einer Entzündung abzuschwächen.

Der richtige Zeitpunkt für die Initiierung der Heilungsprozesse ist dabei ganz entscheidend für den Ausgang der Entzündung: Werden die Reparationsprozesse zu früh eingeleitet, kommt es zu einer unvollständigen Eindämmung der Entzündung [136]. Die Zellfortsatzausbildung der gewebsständigen Makrophagen könnte bei diesem Vorgang eine essenzielle Rolle spielen und die Umlenkung der Neutrophilen initiieren, um den Heilungsprozess individuell voranzutreiben.

Darüber hinaus könnte die Ausbildung von Zellfortsätzen nicht nur als Hilfsmittel zur Kommunikation mit neutrophilen Granulozyten angesehen werden, sondern auch als eine Vergrößerung des Aktionsradius der Makrophagen zur Kontaktaufnahme mit anderen Immunzellen.

In weiteren Untersuchungen konnte herausgearbeitet werden, dass durch die Depletion von Neutrophilen es zu einer früheren Zellfortsatzausbildung der gewebsständigen Makrophagen kommt. Wurden die neutrophilen Granulozyten depletiert, so zeigte sich bei Tieren, die mit einem Ly6G-Antikörper behandelt wurden, ein schnelleres Auftreten von dendritenbildenden gewebsständigen Makrophagen. Dies könnte eine Reaktion der Makrophagen auf Neutrophile darstellen, damit diese ihren Weg zum Entzündungsherd fortsetzen können. Um besser zur Verletzung vorzudringen, scheint es, als ob Neutrophile die Ausbildung von Zellfortsätzen unterdrücken.

3.2. Inhibition und Stimulation der Ausbildung von Zellfortsätzen

In weiteren Experimenten konnten die Mechanismen der Ausbildung von Zellfortsätzen durch Makrophagen geklärt werden: Hier spielt HMGB1 eine entscheidende Rolle.

BoxA wirkt neutralisierend auf HMGB1, ohne die Zytokinausschüttung zu aktivieren [89]. Die Wirkung von BoxA am Koronararterienverschluss-Modell wurde bereits von Andrassy et al. im Jahr 2008 beschrieben: Durch Gabe von BoxA wurde das Ausmaß des Gewebeschadens verringert und die Anzahl der rekrutierten Leukozyten reduziert [83]. In unseren Untersuchungen konnten wir feststellen, dass die mit BoxA behandelte Versuchsgruppe, nach der Induktion eines Laserschadens bis zum Zeitpunkt 240 min keine Ausbildung von Zellfortsätzen der gewebständigen CX₃CR1⁺-Zellen zeigte. Dies unterstützt die These von Andrassy et al., dass eine Inhibierung von HMGB1 die Wirkung der untergegangenen Zellen auf das umliegende Gewebe verringert. Durch das funktionelle Ausschalten durch BoxA kann das DAMP HMGB1 nicht mehr auf andere Immunzellen wirken.

Unter der Wirkung von BoxA bildeten sich deutlich weniger Zellfortsätze an CX₃CR1⁺-Makrophagen aus. Wenn überhaupt, waren diese in geringer Zahl zu sehr späten Zeitpunkten zu finden, was eventuell einen zweiten Stimulus neben HMGB1 vermuten lässt. Interessanterweise korrelierte die Bildung der Zellfortsätze zeitlich mit einem Abfall der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten zur Laserverletzung. Unter Wirkung von BoxA kam es entsprechend zu einem prolongierten Einstrom neutrophiler Granulozyten, da die Ausbildung von Zellfortsätzen der Makrophagen deutlich verringert und verzögert war.

Um zu bestätigen, dass die Ausbildung von Zellfortsätzen von gewebständigen CX₃CR1⁺-Zellen tatsächlich HMGB1-abhängig ist, wurde der Effekt von mutHMGB1 und dsHMGB1 auf die Ausbildung von Zellfortsätzen geprüft. In mutHMGB1 wurden in der Herstellung alle Cysteine durch Serine ersetzt, wodurch im Rahmen der Oxidation keine Disulfidbrücken mehr gebildet werden können. MutHMGB1 induziert die Migration von Leukozyten zum Ort der Entzündung. Makrophagen werden dabei aber durch die reduzierte Form von HMGB1 nicht zur Expression von Zytokinen und Chemokinen angeregt. MutHMGB1 verhält sich wie reduziertes atHMGB1, es lässt sich aber nicht in andere oxidierte Form transferieren [88]. DsHMGB1, oder auch oxidiertes HMGB1, entsteht aus reduziertem HMGB1 (atHMGB1) und ist für die Stimulation von Leukozyten und damit für die Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine zuständig. Es bindet, im Gegensatz zu reduziertem HMGB1, nicht an CXCL12 und spielt keine Rolle in der Chemotaxis [88, 89].

Die Untersuchungsergebnisse spiegeln die von Venereau et al. [89] beschriebenen Eigenschaften der beiden HMGB1-Formen wieder: durch MutHMGB1 findet keine Stimulation von Makrophagen zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine statt – es fand keine Ausbildung von Zellfortsätzen statt. Darüber hinaus kann es auch nicht in andere HMGB1 Formen oxidiert werden, die proinflammatorische Einflüsse auf den Ablauf der Entzündungsreaktion haben könnten.

3.3. Herkunft gewebsständiger CX₃CR1⁺ - Zellen

Mit der Aufklärung der komplexen Herkunft der gewebsständigen Makrophagen befassten sich in der Vergangenheit viele Gruppen: Schulz et al. und Ginhoux et al. konnten beweisen, dass persistierende Makrophagen des adulten Gewebes bereits pränatal von myeloischen Progenitorzellen aus dem Dottersack abstammen [171, 172]. Doch schon bald fand man heraus, dass eine dynamische Balance zwischen zwei ursprünglichen Makrophagenpools herrscht [169]. Es existiert des Weiteren ein Vorkommen an Makrophagen, das sich aus vom Knochenmark abstammenden Monozyten entwickelt haben soll [155]. Neben den Makrophagen, die pränatal aus dem Dottersack abstammen [171, 172], erneuern sich Makrophagen nach der Geburt von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark [155, 175] [174]. Gewebsständige dermale Makrophagen sollen ihren Ursprung bereits vor der Geburt im Dottersack finden, während sie im Laufe der Zeit eine kontinuierliche Erneuerung durch aus dem Knochenmark stammende Ly6C^{hi} Monozyten aus dem Blut erfahren [155, 175].

Die Untersuchungen von Knochenmarkchimären in dieser Arbeit ergaben, dass sich gewebsständige CX₃CR1⁺-Zellen in der Haut acht Wochen nach Transplantation des Knochenmarks nur sehr langsam erneuern lassen. Sie sind daher vermutlich Abkömmlinge einer myeloischen Zellpopulation und werden erst nach einiger Zeit wieder durch Zellen aus dem Knochenmark aufgefrischt. Entsprechend konnten vereinzelt gewebsständige CX₃CR1⁺-Zellen im Gewebe von C57BL/6J-Tieren gefunden werden, welche mit Knochenmark aus CX₃CR1GFP-Tieren transplantiert wurden. Dies untermauert den bisherigen Wissensstand, dass sich gewebsständige dermale Makrophagen ursprünglich aus dem Knochenmark ableiteten, sich aber gleichzeitig durch aus dem Knochenmark abstammende Monozyten entwickeln können.

Wie in der Publikation von Rodrigues und Gurtner beschrieben, deuten die Untersuchungen der hier vorliegenden Arbeit ebenfalls darauf hin, dass der Zusammenhang spezifischer Zellfunktionen in Abhängigkeit zur Funktion der gewebsständigen Makrophagen stehen könnten [169].

3.4. Quantifizierung der dendritenbildenden gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen

Zur weiteren Charakterisierung der dendritenbildenden gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen wurden immunhistologische Untersuchungen durchgeführt: Anhand der Oberflächenmarker F4/80 [179] und CD11c [209, 216] können Makrophagen und DCs immunhistochemisch abgegrenzt werden. Da es keine einheitliche Regelung für die Nomenklatur der Makrophagenpopulation gibt, schlagen Murray et al. eine Einteilung aufgrund ihrer Herkunft, aktivierenden Stimuli und der Expression von Oberflächenmarkern vor. Auch der experimentelle Kontext sollte in die Charakterisierung miteinbezogen werden [178].

Die Untersuchungen für die Quantifizierung dendritenbildender gewebsständiger CX₃CR1⁺-Zellen mit F4/80 und CD11c, nach Induktion einer Laserverletzung, ergaben, dass über die Hälfte (52%) der dendritenbildenden gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen beide Marker exprimierten. Daneben existierte eine Zellgruppe, die neben GFP⁺ auch F4/80⁺ (32 %) Zellen aufwies und eine Population mit CX₃CR1⁺- und somit GFP⁺-Zellen (15 %), die weder F4/80 noch CD11c exprimieren. CD11c⁺ und gleichzeitig GFP⁺-Zellen sind nur mit einem Prozent vertreten. Dendritenbildende gewebsständige CX₃CR1⁺-Zellen stellen somit eine heterogene Zellpopulation dar, die man hinsichtlich ihrer Expression der Oberflächenmarker F4/80 und CD11c einteilen kann. Die Vermutung wird unterstützt durch die Färbung mit CD68: Dendritenbildende gewebsständige CX₃CR1⁺-Zellen, die auch den Oberflächenmarker F4/80 exprimieren, ließen sich ebenfalls durch CD68 markieren.

Wie bereits Rodrigues und Gurtner in ihrer Publikation aus dem Jahr 2017 beschrieben, weisen die Unterschiede in der Herkunft der Makrophagen möglicherweise einen Zusammenhang mit ihren spezifischen Funktionen auf [169].

3.5. Ausbildung von Zellfortsätzen im Clec9a- Cre; Rosa26- tomato; CX₃CR1GFP- Mausmodell

Da durch *ex vivo*-Analysen festgestellt wurde, dass die Mehrheit der dendritenbildenden gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen nicht nur Makrophagen-spezifische Oberflächenrezeptoren, sondern auch Rezeptoren für dendritische Zellen exprimieren, musste ein weiteres Modell in Betracht gezogen werden. Die Erkenntnis aus den vorangegangenen Untersuchungen wurden in ein neues Modell übertragen, mit dem man sowohl das Verhalten von Makrophagen, als auch dendritischer Zellen *in vivo* analysieren konnte: Mit der von Schraml et al. generierten transgenen Mauslinie Clec9a-Cre;Rosa26-tomato und den CX₃CR1GFP-Tieren von Jung et al. war es möglich eine neue Linie zu schaffen [112, 215].

Zur Beantwortung der Fragestellung zur Charakterisierung der dendritenbildenden gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen, wurde das Clec9a-Cre;Rosa26-tomato;CX₃CR1GFP-Mausmodell zu Hilfe gezogen. Durch das unter Kontrolle des Clec9a-Promotors eingebaute red fluorescent protein (RFP) stellten sich dendritische Zellen im 2-Photonen-Mikroskop in roter Farbe dar, während weiterhin CX₃CR1⁺-Zellen das GFP exprimieren und in Grün erscheinen. Dadurch können DCs und Makrophagen visuell im 2-Photonen-Mikroskop unterschieden und analysiert werden.

Bei der Untersuchung der sterilen Inflammation auf die Ausbildung von Zellfortsätzen im Clec9a-Cre;Rosa26-tomato;CX₃CR1GFP-Mausmodell konnte interessanterweise festgestellt werden, dass drei unterschiedliche Zellpopulationen am Vorgang beteiligt waren: CX₃CR1⁺/Clec9a⁻-Zellen stellte die Population mit den meisten Zellausläufern dar, wohingegen CX₃CR1⁻/Clec9a⁺-Zellen wenig Ausbildung von Fortsätzen zeigten. Da die Mehrheit der Zellfortsatzausbildungen bei gewebsständigen CX₃CR1⁺/Clec9a⁻-Zellen auftrat, entspricht dies den vorangegangenen Untersuchungsergebnisse und unterstreicht den Eindruck einer interagierenden, kommunizierenden, aber dennoch gewebsständigen Zellart, die eine wichtige Rolle im Ablauf der sterilen Entzündung einnimmt. Aufgrund ihrer Immobilität und ihrer CX₃CR1⁺/Clec9a⁻-Expression sind diese Zellen mit der Fähigkeit zur Ausbildung von Zellausläufern der Gruppe der Makrophagen zuzuordnen.

Überraschenderweise gab es eine dritte Population von GFP⁺/RFP⁺-Zellen, die aber vergleichsweise eine geringe Zellfortsatzausbildung aufwies.

Diese Erkenntnis unterstreicht erneut die allgemeine Auffassung, dass die Population der Makrophagen heterogen, und deshalb schwer zu charakterisieren und zu vereinheitlichen ist. Nicht außer Acht lassen darf man an dieser Stelle folgende Tatsache: Da durch den Clec9a-Cre;Rosa26-tomato-Reporter nach Cre-vermittelter Exzision des Transkriptionsblocks das rot-fluoreszierende Protein unter Kontrolle des konstruktiven Rosa26-Promotors gebildet wird, werden alle Zellen auch unabhängig davon, ob der Clec9a-Promotor gerade aktiv ist, markiert. Dahingegen wird beim CX₃CR1GFP-Mausmodell durch das GFP-Signal eine Echtzeitexpression des CX₃CR1-Gens angezeigt.

Da dass das DNGR-1-Protein also auch auf Zellen zu finden ist, die Abkömmlinge von DC-Vorläuferzellen sind, werden diese dadurch ebenfalls detektierbar [215].

3.6. Bedeutung der Ergebnisse im Kontext einer sterilen Inflammation

Während des Ablaufs einer Entzündung muss das Immunsystem die Aufgabe eines Balanceaktes zwischen Bekämpfung bzw. Elimination des Erregers als auch der Einleitung der Resolutionsphase und dem Vorantreiben der Heilungsprozesse erfüllen. Unkontrollierte und überschießende sterile Entzündungsreaktionen beinhalten das Risiko einer Organschädigung – wie es in Myokardinfarkt oder Schlaganfall der Fall ist [71-73].

Gewebsständige Makrophagen, die sich nur sehr langsam aus Knochenmarkzellen regenerieren, liegen unter Ruhebedingungen im Gewebe verteilt. Kommt es zu einem sterilen Gewebeschaden, so werden DAMPs (wie HMGB1) durch nekrotische Zellen in die Umgebung freigesetzt. Angelockt durch DAMPs infiltrieren zunächst neutrophile Granulozyten den Entzündungsbereich und tasten das Gewebe mit zufälligen Migrationsmustern ab - mit der Aufgabe der Detektion des Entzündungsfokus [115]. Kurze Zeit später kommt es zu einem schwarmartigen Neutrophileneinstrom ins Gewebe, der nach ca. 100min sein Maximum erreicht. Eine konstante Anzahl an destruktiven Neutrophilen lagert sich nach einigen Stunden zu stabilen Clustern zusammen, eingewanderte Monozyten sammeln sich in deren Umgebung an und sorgen für eine verbesserte Stabilität des Zellkonstrukts [115].

Es entsteht ein proinflammatorisches Milieu, das von migrierten Makrophagen mit M1-Eigenschaften und deren Ausschüttung von entzündungsfördernden Zytokinen beherrscht wird [115]. Gewebsständige Makrophagen bilden nach ca. drei Stunden dendritenartige Zellausläufer aus und treten in Kontakt mit neutrophilen Granulozyten.

Die anschließende Resolutionsphase wird durch die Umkehr in ein antiinflammatorisches Milieu bestimmt und Makrophagen beginnen mit der Phagozytose von apoptotischen neutrophilen Granulozyten. Dadurch werden M2-Makrophagen aktiviert, schütten entzündungshemmende Stoffe aus und leiten so den Heilungsprozess ein [8, 136, 203]. Nach Kontakt zu Zellausläufern gewebsständiger Makrophagen ändern neutrophile Granulozyten die Richtung und migrieren vom Ort der Entzündung weg. Die Anzahl der zum Gewebeschaden migrierenden Neutrophilen wird dadurch zusätzlich verringert und die Auflösung der Entzündung vorangetrieben.

Die Polarisierung von klassisch aktivierten inflammatorischen M1-Makrophagen und alternativ aktivierten antiinflammatorischen M2-Makrophagen und deren Anpassungsfähigkeiten an die Umgebung nehmen eine wichtige Rolle im Verlauf des Entzündungsgeschehens ein [256]. Das Immunsystem hat die Aufgabe den kritischen Zeitpunkt zwischen überschießender Reaktion und Initiierung des Heilungsprozesses zu erkennen und darauf zu reagieren.

Die Untersuchung der Rolle der antiinflammatorischen Wirkung der dendritenbildenden gewebsständigen Makrophagen und ihre Zuordnung zu protektiven M2-Makrophagenpopulation sollte in kardiovaskulären Krankheitsprozessen weiter vorangetrieben werden: Bereits Nahrendorf et al. bewiesen das Vorkommen von gewebsständigen M2-Makrophagenpopulationen im kardialen Gewebe [176]. Andrassy et al. konnten durch die Inhibition von HMGB1 durch BoxA im Koronararterienverschluss das Ausmaß des Gewebeschadens signifikant verringern [83]. In den hier vorliegenden Untersuchungsergebnissen wirkt HMGB1 einerseits stimulierend auf die Bildung der Zellfortsätze von gewebsständigen Makrophagen, andererseits unterdrückte BoxA die Zellfortsatzbildung ebenfalls signifikant. Die weitere Untersuchung der Inhibition von HMGB1 oder weiteren freigesetzten DAMPs im Zusammenhang mit protektiven Eigenschaften dendritenbildender gewebsständiger Makrophagen könnten zu neuen Therapieansätzen in kardiovaskulären Erkrankungen führen.

Hinsichtlich der sehr langsamen Erneuerung der gewebsständigen Makrophagen wäre es durchaus auch denkbar, dass Alterungsprozesse, die damit verbundene langsamere Regeneration und der mögliche Funktionsverlust der Bildung von Zellausläufern der dendritenbildenden gewebsständigen Makrophagen im Alter überschießende Immunreaktionen begünstigen könnte. Hierbei könnten Versuche mit gealterten Tieren Aufschluss über das Verhalten dieser Zellen geben und gegebenenfalls mögliche Antworten auf die Immunsuppression im Alter geben.

Die Heterogenität der gewebsständigen Makrophagen, ihre Anpassungsfähigkeit und die Expression verschiedenster Oberflächenmarker stellen zusammenfassend eine komplexe Zellpopulation mit viel Potenzial für therapeutische Ansätze dar.

4. Ausblick

Die vorliegenden *in vivo*-Untersuchungen bezüglich der Interaktionen neutrophiler Granulozyten mit Makrophagen haben gezeigt, dass nach Depletion der Neutrophilen eine Stimulierung der Ausbildung von Zellausläufern zu sehen ist. Im Umkehrschluss wäre nun sehr interessant zu sehen, wie sich das Verhalten der Neutrophilen in Abwesenheit der gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen ändert.

Zur weiteren *ex vivo*-Charakterisierung der gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen soll das Verfahren der Histozytometrie angewendet werden [257]. Mit dieser analytischen Mikroskopie-Technik können phänotypisch komplexe Zellpopulationen in Geweben visualisiert und quantifiziert werden.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Die hier vorliegende Arbeit analysiert die Interaktion von gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen mit neutrophilen Granulozyten unter der Bedingung einer sterilen Inflammation *in vivo*. Durch das 2-Photonen-Mikroskop wurde im Ohrmodell der Maus ein Gewebeschaden in der Nähe einer postkapillären Venole mittels eines Lasers erzeugt, der eine sterile Entzündung im interstitiellen Raum hervorruft. Dadurch wird eine spezifische Immunreaktion angestoßen, die über einen Zeitraum von bis zu sieben Stunden in dreidimensionalen Videoaufnahmen festgehalten und im Anschluss ausgewertet werden kann.

In sterilen Entzündungsprozessen nimmt das Zusammenspiel neutrophiler Granulozyten und gewebsständiger Makrophagen eine Schlüsselrolle in der Entzündungskaskade ein. Über den genauen Ablauf dieser interstitiellen Zellinteraktionen ist bisher nur wenig bekannt.

Durch diese Arbeit konnte gezeigt werden, dass gewebsständige CX₃CR1⁺-Zellen unter Einfluss einer sterilen Entzündung Zellausläufer ausbilden. Mit diesen treten sie mit neutrophilen Granulozyten in Kontakt, die zum Ort der Entzündung migrieren. Durch diese Interaktion migrierten sie vom Laserschaden weg und der Einstrom der Neutrophilen zum Nekrosefokus wurde unterbunden. Durch Depletion der Neutrophilen wurde eine verstärkte Dendritenbildung der gewebsständigen Makrophagen beobachtet. In weiteren Versuchen unter Verwendung des HMGB1 Antagonisten BoxA konnte eine Unterdrückung der Dendritenbildung erreicht werden und mit Gabe von dsHMGB1 eine verstärkte Bildung der Zellfortsätze gesehen werden. Um die Herkunft der dendritenbildenden gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen zu bestimmen, wurden Knochenmarkchimären erstellt, durch die die Abstammung aus gewebsständigen Zellen gezeigt werden konnte.

Durch die immunhistologische Analyse konnte nachgewiesen werden, dass die Hälfte der Zellen mit Dendritenbildung die Oberflächenmoleküle F4/80 und CD11c exprimieren. Im Clec-Cre;Rosa26-tomato;CX₃CR1GFP-Modell konnten gewebsständige CX₃CR1⁺/Clec9a⁻-Zellen im Zusammenspiel mit dendritischen Zellen als die führende dendritenbildende Zellpopulation herausgearbeitet werden. Die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse der Pathomechanismen der sterilen

Entzündungsprozesse könnten zu neuen Ansätzen für die Entwicklung von Immunsuppressiva und antiinflammatorischen Therapien für kardiovaskuläre Erkrankungen führen.

VIII. SUMMARY

***In vivo* interaction of tissue resident CX₃CR1⁺ cells with neutrophils in sterile inflammation**

This thesis analysed the *in vivo* interaction of tissue resident CX₃CR1⁺ cells with neutrophils in the background of sterile inflammation. A laser injury was placed in the mouse skin close to a postcapillary venule with the help of intravital 2-photon microscopy which simulated a sterile tissue injury. Using 3D video recordings the reaction of the immune system was captured for up to seven hours. The interplay of neutrophils and tissue resident macrophages plays a key role in the processes of sterile inflammation, but the mechanisms of cell-cell interactions are still unknown.

Under condition of sterile inflammation this work showed that tissue resident CX₃CR1⁺ macrophages have the ability to form dendrites and interact with migrating neutrophils. Interacting neutrophils were guided away from the laser injury. Enhanced and earlier dendrite formation was noticed after neutrophils were depleted. Dendrite formation was inhibited by the HMGB1 antagonist BoxA and enhanced after dsHMGB1 injection. Bone marrow transplantations showed that dendrite forming tissue resident CX₃CR1⁺ macrophages are radioresistant and potentially originate from the bone marrow but have a low turnover rate. Immunohistochemical stainings revealed that half of dendrite forming tissue resident CX₃CR1⁺ cells express macrophage marker F4/80 and the dendritic cell marker CD11c. *In vivo* studies of Clec9a-CX₃CR1GFP mouse model showed dendrite formation of tissue resident CX₃CR1⁺/Clec9a⁻ cells. In summary, these results can lead to new therapeutic approaches in the development of immunosuppressives and antiinflammatory therapies in cardiovascular diseases.

IX. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
atHMGB1	all-thiol HMGB1
APCs	Antigen präsentierende Zellen
AV Blocks	atriventrikuläre Blockaden
aCKRs	atypische Chemokinrezeptoren
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
CLRs	C-Typ Lektinrezeptoren
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
DNGR-1	Dendritic cell Lectin group receptor-1
DCs	Dendritische Zellen
dsHMGB1	Disulfid HMGB1
3D	dreidimensional
FBS	Fetal Bovine Serum
GFP	Green Fluorescent Protein
HSPs	Heat-Shock Protein
HMGB1	High Mobility Group Box 1
ITAX	Integrin alpha X
IFN	Interferon
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
CLSM	konfokales Laser-Scanning Mikroskop
cCKRs	konventionelle Chemokin-Rezeptoren
cDCs	konventionelle Dendritische Zellen
KG	Körpergewicht
ml	Milliliter
mM	Millimol
mutHMGB1	3s-HMGB1

MyD88	Myeloide differentiation Factor 88
NKs	Natürliche Killerzellen
NETs	Neutrophil extrazellulär Traps
NLRs	Nod-like Rezeptoren
NF	Nuklearer Faktor
PAMPs	Pathogen-associated Molecular patterns
PRRs	Pattern-recognition Rezeptoren
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
pDCs	Plasmazytoide dendritische Zellen
RFP	Red fluorescent Protein
sec	Sekunden
SAA	Serumamyloid A
SEM	Standardabweichung
s.c.	subkutan
oxHMGB1	Sulfonyl HMGB1
TLRs	Toll like Rezeptoren
cm	Zentimeter
2-Photoen-Mikroskop	Zwei-Photoen-Mikroskop
RAGE	Receptor for advanced glycation endproducts

X. TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1: Aufgaben gewebständiger dendritischer Zellen und Makrophagen in Homöostase und Krankheitsprozessen. Tabelle nach Lech et al 2012.</i>	<i>34</i>
<i>Tabelle 2: Zusammensetzung der Narkose</i>	<i>42</i>
<i>Tabelle 3: Fluoreszenzfarbstoffe zur Darstellung der Gefäße.....</i>	<i>54</i>
<i>Tabelle 4: Für das Whole Mount Staining herangezogene Antikörper</i>	<i>59</i>
<i>Tabelle 5: CX₃CR1GFP-Tiere mit und ohne Laserverletzung, Analyse der Bewegungsrichtung der neutrophilen Granulozyten</i>	<i>61</i>
<i>Tabelle 6: CX₃CR1GFP-Tiere zur Depletion der neutrophilen Granulozyten.....</i>	<i>62</i>
<i>Tabelle 7: CX₃CR1GFP-Tiere zur Durchführung der Versuche mit HMGB1-Redoxformen und Kontrollen</i>	<i>62</i>
<i>Tabelle 8: CX₃CR1GFP-Tiere zur Durchführung der Versuche mit BoxA und Kontrollen</i>	<i>62</i>
<i>Tabelle 9: C57BL/6J-Donortiere in CX₃CR1GFP-Empfängertiere</i>	<i>62</i>
<i>Tabelle 10: CX₃CR1GFP-Donortiere in C57B6/J-Empfängertiere</i>	<i>62</i>
<i>Tabelle 11: Clec9a-Cre;Rosa26-tomato;CX₃CR1GFP-Tiere zur Untersuchung der Dendritenbildung von CX₃CR1⁺- und Clec9a⁺-Zellen nach Laserverletzung</i>	<i>62</i>
<i>Tabelle 12: CX₃CR1GFP-Tiere zur Durchführung der histologischen Färbung nach Laserverletzung</i>	<i>63</i>
<i>Tabelle 13: Statistische Werte der dendritenbildenden gewebständigen CX₃CR1⁺ Zellen/Sichtfeld mit und ohne Laserverletzung</i>	<i>70</i>
<i>Tabelle 14: Statistische Auswertung der Depletionsgruppe und Isotyp-Kontrollgruppe.....</i>	<i>77</i>
<i>Tabelle 15: Statistische Auswertung der Gruppe mit BoxA und der mit dem Isotypen behandelten Kontrollgruppe.....</i>	<i>79</i>
<i>Tabelle 16: Statistische Auswertung der HMGB1-Redoxformen gegenüber der Kontrollgruppe mit PBS.....</i>	<i>83</i>

XI. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1: Darstellung der Todesursachen weltweit.....</i>	<i>1</i>
<i>Abbildung 2: Die Entstehung eines Circulus vitiosus in chronischen Erkrankungen.....</i>	<i>6</i>
<i>Abbildung 3: Veranschaulichung der Lokalisation von HMGB1 in der DNA und im Zellkern eukaryotischer Zellen.....</i>	<i>8</i>
<i>Abbildung 4: Schematische Darstellung der Struktur von HMGB1</i>	<i>8</i>
<i>Abbildung 5: Wirkungsspektrum des HMGB1 nach Kang et al 2014</i>	<i>9</i>
<i>Abbildung 6: Darstellung der verschiedenen HMGB1-Freigabemechanismen... </i>	<i>10</i>
<i>Abbildung 7: Die Aktivität von HMGB1 während einer Muskelverletzung mit Cardiotoxin</i>	<i>13</i>
<i>Abbildung 8: HMGB1-Redoxformen und ihre Rezeptoren</i>	<i>13</i>
<i>Abbildung 9: Veranschaulichung der Rolle von Chemokinen und deren Rezeptoren.....</i>	<i>15</i>
<i>Abbildung 10: Darstellung der bisher beschriebenen Chemokine</i>	<i>17</i>
<i>Abbildung 11: Darstellung der Lokalisation des Chemokinrezeptors CX₃CR1 und seines Liganden CX₃CL1 bei der Rekrutierung von Immunzellen</i>	<i>18</i>
<i>Abbildung 12: Schematische Darstellung der mehrphasigen interstitiellen Migration der neutrophilen Granulozyten.....</i>	<i>22</i>
<i>Abbildung 13: Ursprung und Differenzierung von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen.....</i>	<i>23</i>
<i>Abbildung 14: Das Schicksal der Makrophagen während der sterilen Inflammation</i>	<i>25</i>
<i>Abbildung 15: Herkunft gewebsständiger Makrophagen der Haut.....</i>	<i>27</i>
<i>Abbildung 16: Historische Einteilung der Makrophagen.....</i>	<i>27</i>
<i>Abbildung 17: Darstellung der aktuellen Einteilung der heterogenen Makrophagenpopulation.....</i>	<i>28</i>
<i>Abbildung 18: Schematisierte Illustration des Immunnetzwerkes der Haut.....</i>	<i>30</i>
<i>Abbildung 19: Das Jabłoński-Diagramm zeigt die Fluoreszenzanregung durch Photonen</i>	<i>48</i>
<i>Abbildung 20: Schematische Darstellung der Unterschiede in der Streuung von konfokalem Mikroskop und 2-Photonen-Mikroskop</i>	<i>49</i>
<i>Abbildung 21: Strahlengang und Komponenten des 2-Photonen-Mikroskops.....</i>	<i>51</i>
<i>Abbildung 22: Durch das 2-Photonen-Mikroskop visualisierter Querschnitt durch</i>	

<i>das murine Ohrgewebe</i>	<i>52</i>
<i>Abbildung 23: Sichtfeld des zu untersuchenden Gewebes zu Zeitpunkten vor und nach der Laserverletzung.....</i>	<i>67</i>
<i>Abbildung 24: Morphologische Veränderung einer gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zelle zu verschiedenen Zeitpunkten unter Bedingung einer sterilen Inflammation</i>	<i>68</i>
<i>Abbildung 25: Dendritenbildung einer gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zelle.....</i>	<i>69</i>
<i>Abbildung 26: Anzahl der dendritenbildenden gewebsständigen CX₃CR1⁺- Zellen mit und ohne lokalem Laserschaden.....</i>	<i>70</i>
<i>Abbildung 27: Kontakt eines neutrophilen Granulozyten mit einer dendritenbildenden gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zelle.....</i>	<i>72</i>
<i>Abbildung 28: Bewegungsmuster der neutrophilen Granulozyten mit und ohne Interaktion mit dendritenbildenden gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen.....</i>	<i>73</i>
<i>Abbildung 29: Analyse des Bewegungsmusters der neutrophilen Granulozyten mit und ohne Interaktion mit dendritenbildenden gewebsständigen CX₃CR1⁺- Zellen</i>	<i>74</i>
<i>Abbildung 30: Anzahl der gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen über die Zeit mit und ohne Einfluss der Neutrophilendepletion.....</i>	<i>76</i>
<i>Abbildung 31: Gegenüberstellung der Untersuchung der Ausbildung von Zellausläufern unter Einfluss von BoxA und einer Isotyp-Kontrollgruppe mit PBS nach Setzen einer Laserverletzung.....</i>	<i>78</i>
<i>Abbildung 32: Korrelation von Neutrophileneinstrom und Ausbildung von Zellausläufern nach Setzen einer Laserverletzung</i>	<i>79</i>
<i>Abbildung 33: Korrelation von Neutrophileneinstrom und Ausbildung von Zellausläufern unter Einfluss von BoxA.....</i>	<i>80</i>
<i>Abbildung 34: Darstellung des Einflusses von HMGB1-Redoxformen auf die Ausbildung von Zellausläufern der gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen.....</i>	<i>82</i>
<i>Abbildung 35: Aufnahme acht Wochen nach Transplantation von C57BL/6J-Knochenmark in CX₃CR1-Empfängertiere</i>	<i>84</i>
<i>Abbildung 36: Aufnahme acht Wochen nach Transplantation von CX₃CR1GFP-Knochenmark in C57BL/6J-Empfängertiere.....</i>	<i>85</i>
<i>Abbildung 37: Konfokale Übersichtsaufnahme des dermalen Whole Mount Stainings ohne Laserverletzung</i>	<i>86</i>
<i>Abbildung 38: Konfokale Übersichtsaufnahme des dermalen Whole Mount Stainings mit Laserverletzung</i>	<i>87</i>

<i>Abbildung 39: Konfokale Großaufnahme mehrerer gewebsständiger CX₃CR1⁺/F4/80⁺/CD11c⁺-Zellen unter Bedingungen einer sterilen Inflammation</i>	88
<i>Abbildung 40: Gewebsständige CX₃CR1⁺/F4/80⁺/CD11c⁻ Zelle in der Nähe der Laserverletzung</i>	89
<i>Abbildung 41: Konfokale Aufnahme einer immunhistologischen Färbung mit F4/80 und CD68 nach Induktion eines Laserschadens im angrenzenden Gewebe</i>	90
<i>Abbildung 42: Gegenüberstellung der Färbung mit CD11c und der Isotyp-Kontrolle IgG</i>	91
<i>Abbildung 43: Gegenüberstellung der Färbung mit F4/80 und der Isotyp-Kontrolle IgG2a</i>	91
<i>Abbildung 44: Quantifizierung der gewebsständigen CX₃CR1⁺-, F4/80⁺- und CD11c⁺-Zellen unter Bedingungen der sterilen Inflammation im Whole Mount Staining ex vivo</i>	92
<i>Abbildung 45: Quantifizierung der gewebsständigen CX₃CR1⁺-Zellen mit Ausbildung von Zellfortsätzen nach Induktion einer Laserverletzung ex vivo</i>	94
<i>Abbildung 46: Sichtfeld im Clec9a-Cre;Rosa26-tomato;CX₃CR1GFP-Modell mit Laserverletzung</i>	96
<i>Abbildung 47: Dendritenbildung im Clec9a-Cre;Rosa26-tomato;CX₃CR1GFP-Mausmodell</i>	97
<i>Abbildung 48: Exemplarische Ausbildung von Zellfortsätzen einer CX₃CR1⁺-Zelle im Clec9a-Cre;Rosa26-tomato;CX₃CR1GFP-Mausmodell</i>	98

XII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Joseph, P., et al., *Reducing the Global Burden of Cardiovascular Disease, Part 1: The Epidemiology and Risk Factors*. Circ Res, 2017. **121**(6): p. 677-694.
2. Omran, A.R., *The epidemiologic transition. A theory of the epidemiology of population change*. Milbank Mem Fund Q, 1971. **49**(4): p. 509-38.
3. Kassebaum, N.J., et al., *Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 315 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE), 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015*. The Lancet, 2016. **388**(10053): p. 1603-1658.
4. *Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015*. Lancet, 2016. **388**(10053): p. 1459-1544.
5. Cannon, B., *Cardiovascular disease: Biochemistry to behaviour*. Nature, 2013. **493**(7434): p. S2-3.
6. Chen, G.Y. and G. Nunez, *Sterile inflammation: sensing and reacting to damage*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(12): p. 826-37.
7. Lech, M., et al., *Tissues use resident dendritic cells and macrophages to maintain homeostasis and to regain homeostasis upon tissue injury: the immunoregulatory role of changing tissue environments*. Mediators Inflamm, 2012. **2012**: p. 951390.
8. Elliott, M.R., K.M. Koster, and P.S. Murphy, *Efferocytosis Signaling in the Regulation of Macrophage Inflammatory Responses*. J Immunol, 2017. **198**(4): p. 1387-1394.

9. Headland, S.E. and L.V. Norling, *The resolution of inflammation: Principles and challenges*. Semin Immunol, 2015. **27**(3): p. 149-60.
10. Gilroy, D. and R. De Maeyer, *New insights into the resolution of inflammation*. Semin Immunol, 2015. **27**(3): p. 161-8.
11. Serhan, C.N., *Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology*. Nature, 2014. **510**: p. 92.
12. Frank, A., et al., *Myocardial ischemia reperfusion injury: from basic science to clinical bedside*. Semin Cardiothorac Vasc Anesth, 2012. **16**(3): p. 123-32.
13. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
14. Gisterå, A. and G.K. Hansson, *The immunology of atherosclerosis*. Nature Reviews Nephrology, 2017. **13**: p. 368.
15. Mossman, B.T. and A. Churg, *Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **157**(5 Pt 1): p. 1666-80.
16. Desai, J., S. Steiger, and H.J. Anders, *Molecular Pathophysiology of Gout*. Trends Mol Med, 2017. **23**(8): p. 756-768.
17. Busso, N. and A. So, *Mechanisms of inflammation in gout*. Arthritis Res Ther, 2010. **12**(2): p. 206.
18. Weiner, H.L. and D. Frenkel, *Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(5): p. 404-16.
19. Coussens, L.M. and Z. Werb, *Inflammation and cancer*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 860-7.

20. Peiseler, M. and P. Kubes, *Macrophages play an essential role in trauma-induced sterile inflammation and tissue repair*. Eur J Trauma Emerg Surg, 2018.
21. Zhang, X. and D.M. Mosser, *Macrophage activation by endogenous danger signals*. J Pathol, 2008. **214**(2): p. 161-78.
22. Roh, J.S. and D.H. Sohn, *Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases*. Immune Netw, 2018. **18**(4): p. e27.
23. Lee, M.S. and Y.J. Kim, *Pattern-recognition receptor signaling initiated from extracellular, membrane, and cytoplasmic space*. Mol Cells, 2007. **23**(1): p. 1-10.
24. Feldman, N., A. Rotter-Maskowitz, and E. Okun, *DAMPs as mediators of sterile inflammation in aging-related pathologies*. Ageing Res Rev, 2015. **24**(Pt A): p. 29-39.
25. Medzhitov, R., *Inflammation 2010: new adventures of an old flame*. Cell, 2010. **140**(6): p. 771-6.
26. Scrivo, R., et al., *Inflammation as "common soil" of the multifactorial diseases*. Autoimmun Rev, 2011. **10**(7): p. 369-74.
27. Zheng, Y., S.E. Gardner, and M.C. Clarke, *Cell death, damage-associated molecular patterns, and sterile inflammation in cardiovascular disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(12): p. 2781-6.
28. Rock, K.L., et al., *The sterile inflammatory response*. Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 321-42.
29. Takeuchi, O. and S. Akira, *Pattern recognition receptors and inflammation*. Cell, 2010. **140**(6): p. 805-20.

30. Anders, H.J., *Innate pathogen recognition in the kidney: toll-like receptors, NOD-like receptors, and RIG-like helicases*. *Kidney Int*, 2007. **72**(9): p. 1051-6.
31. Janeway, C.A., Jr., *Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1989. **54 Pt 1**: p. 1-13.
32. Kono, H., A. Onda, and T. Yanagida, *Molecular determinants of sterile inflammation*. *Curr Opin Immunol*, 2014. **26**: p. 147-56.
33. Matzinger, P., *Tolerance, danger, and the extended Family*. *Annu. Rev. Immunol.* , 1994. **12**: p. 991-1045.
34. Gallucci, S., M. Lolkema, and P. Matzinger, *Natural adjuvants: Endogenous activators of dendritic cells*. *Nature Medicine*, 1999. **5**: p. 1249.
35. Shi, Y., W. Zheng, and K.L. Rock, *Cell injury releases endogenous adjuvants that stimulate cytotoxic T cell responses*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000. **97**(26): p. 14590-14595.
36. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. *Cell*, 2006. **124**(4): p. 783-801.
37. Majno, G. and I. Joris, *Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death*. *Am J Pathol*, 1995. **146**(1): p. 3-15.
38. Majno, G., M. La Gattuta, and T.E. Thompson, *Cellular death and necrosis: chemical, physical and morphologic changes in rat liver*. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med*, 1960. **333**: p. 421-65.
39. Venereau, E., C. Ceriotti, and M.E. Bianchi, *DAMPs from Cell Death to New Life*. *Front Immunol*, 2015. **6**: p. 422.

40. Smiley, S.T., J.A. King, and W.W. Hancock, *Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4*. J Immunol, 2001. **167**(5): p. 2887-94.
41. Sokolove, J., et al., *Immune complexes containing citrullinated fibrinogen costimulate macrophages via Toll-like receptor 4 and Fcγ receptor*. Arthritis & Rheumatism, 2011. **63**(1): p. 53-62.
42. Sohn, D.H., et al., *Plasma proteins present in osteoarthritic synovial fluid can stimulate cytokine production via Toll-like receptor 4*. Arthritis Res Ther, 2012. **14**(1): p. R7.
43. Ye, R.D. and L. Sun, *Emerging functions of serum amyloid A in inflammation*. J Leukoc Biol, 2015. **98**(6): p. 923-9.
44. Hansson, G.K., *Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease*. N Engl J Med, 2005. **352**(16): p. 1685-95.
45. Hansson, G.K. and A. Hermansson, *The immune system in atherosclerosis*. Nat Immunol, 2011. **12**(3): p. 204-12.
46. Bianchi, M.E., et al., *High-mobility group box 1 protein orchestrates responses to tissue damage via inflammation, innate and adaptive immunity, and tissue repair*. Immunol Rev, 2017. **280**(1): p. 74-82.
47. Scaffidi, P., T. Misteli, and M.E. Bianchi, *Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation*. Nature, 2002. **418**(6894): p. 191-5.
48. Goodwin, G.H., C. Sanders, and E.W. Johns, *A New Group of Chromatin-Associated Proteins with a High Content of Acidic and Basic Amino Acids*. European Journal of Biochemistry, 1973. **38**(1): p. 14-19.

49. Goodwin, G.H. and E.W. Johns, *Chapter 15 The Isolation and Purification of the High Mobility Group (HMG) Nonhistone Chromosomal Proteins*, in *Methods in Cell Biology*, G. Stein, J. Stein, and L.J. Kleinsmith, Editors. 1977, Academic Press. p. 257-267.
50. Musumeci, D., G.N. Roviello, and D. Montesarchio, *An overview on HMGB1 inhibitors as potential therapeutic agents in HMGB1-related pathologies*. *Pharmacol Ther*, 2014. **141**(3): p. 347-57.
51. Muller, S., et al., *New EMBO members' review: the double life of HMGB1 chromatin protein: architectural factor and extracellular signal*. *Embo j*, 2001. **20**(16): p. 4337-40.
52. Thomas, J.O., *HMGI and 2: architectural DNA-binding proteins*. *Biochem Soc Trans*, 2001. **29**(Pt 4): p. 395-401.
53. He, S.J., et al., *The dual role and therapeutic potential of high-mobility group box 1 in cancer*. *Oncotarget*, 2017. **8**(38): p. 64534-64550.
54. Wang, H., et al., *HMGB1 as a potential therapeutic target*. *Novartis Found Symp*, 2007. **280**: p. 73-85; discussion 85-91, 160-4.
55. Andersson, U., H. Yang, and H. Harris, *Extracellular HMGB1 as a therapeutic target in inflammatory diseases*. *Expert Opin Ther Targets*, 2018. **22**(3): p. 263-277.
56. Venereau, E., et al., *HMGB1 as biomarker and drug target*. *Pharmacol Res*, 2016. **111**: p. 534-544.
57. Degryse, B., et al., *The high mobility group (HMG) boxes of the nuclear protein HMGI induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells*. *J Cell Biol*, 2001. **152**(6): p. 1197-206.

58. Kang, R., et al., *HMGB1 in health and disease*. Mol Aspects Med, 2014. **40**: p. 1-116.
59. Palumbo, R., et al., *Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation*. The Journal of Cell Biology, 2004. **164**(3): p. 441-449.
60. Wang, H., H. Yang, and K.J. Tracey, *Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis*. Journal of Internal Medicine, 2004. **255**(3): p. 320-331.
61. Pisetsky, D.S., H. Erlandsson-Harris, and U. Andersson, *High-mobility group box protein 1 (HMGB1): an alarmin mediating the pathogenesis of rheumatic disease*. Arthritis Research & Therapy, 2008. **10**(3): p. 209.
62. Andersson, U. and H.E. Harris, *The role of HMGB1 in the pathogenesis of rheumatic disease*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1799**(1-2): p. 141-8.
63. Li, W., A.E. Sama, and H. Wang, *Role of HMGB1 in cardiovascular diseases*. Current Opinion in Pharmacology, 2006. **6**(2): p. 130-135.
64. Wang, H., et al., *HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice*. Science, 1999. **285**(5425): p. 248-51.
65. Bonaldi, T., et al., *Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion*. Embo j, 2003. **22**(20): p. 5551-60.
66. Chen, G., et al., *Bacterial endotoxin stimulates macrophages to release HMGB1 partly through CD14- and TNF-dependent mechanisms*. J Leukoc Biol, 2004. **76**(5): p. 994-1001.
67. Andersson, U., H. Yang, and H. Harris, *Extracellular HMGB1 as a therapeutic target in inflammatory diseases*. Expert Opin Ther Targets, 2018: p. 1-15.

68. Yang, H., et al., *The many faces of HMGB1: molecular structure-functional activity in inflammation, apoptosis, and chemotaxis*. J Leukoc Biol, 2013. **93**(6): p. 865-73.
69. Andersson, U., D.J. Antoine, and K.J. Tracey, *The functions of HMGB1 depend on molecular localization and post-translational modifications*. J Intern Med, 2014. **276**(5): p. 420-4.
70. Yang, H., et al., *MD-2 is required for disulfide HMGB1-dependent TLR4 signaling*. J Exp Med, 2015. **212**(1): p. 5-14.
71. Gonelevue, S., et al., *Sterile Inflammatory Role of High Mobility Group Box 1 Protein: Biological Functions and Involvement in Disease*. J Vasc Res, 2018. **55**(4): p. 244-254.
72. Boonyaratanakornkit, V., et al., *High-mobility group chromatin proteins 1 and 2 functionally interact with steroid hormone receptors to enhance their DNA binding in vitro and transcriptional activity in mammalian cells*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(8): p. 4471-87.
73. Hori, O., et al., *The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphotericin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphotericin in the developing nervous system*. J Biol Chem, 1995. **270**(43): p. 25752-61.
74. Yang, H., et al., *A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(26): p. 11942-7.
75. LeBlanc, P.M., et al., *An immunogenic peptide in the A-box of HMGB1 protein reverses apoptosis-induced tolerance through RAGE receptor*. J Biol Chem, 2014. **289**(11): p. 7777-86.

76. He, Q., et al., *HMGB1 promotes the synthesis of pro-IL-1beta and pro-IL-18 by activation of p38 MAPK and NF-kappaB through receptors for advanced glycation end-products in macrophages*. Asian Pac J Cancer Prev, 2012. **13**(4): p. 1365-70.
77. Friggeri, A., et al., *Participation of the receptor for advanced glycation end products in efferocytosis*. J Immunol, 2011. **186**(11): p. 6191-8.
78. Liu, G., et al., *High mobility group protein-1 inhibits phagocytosis of apoptotic neutrophils through binding to phosphatidylserine*. J Immunol, 2008. **181**(6): p. 4240-6.
79. Hreggvidsdottir, H.S., et al., *The alarmin HMGB1 acts in synergy with endogenous and exogenous danger signals to promote inflammation*. J Leukoc Biol, 2009. **86**(3): p. 655-62.
80. Sha, Y., et al., *HMGB1 develops enhanced proinflammatory activity by binding to cytokines*. J Immunol, 2008. **180**(4): p. 2531-7.
81. Goldstein, R.S., et al., *Elevated high-mobility group box 1 levels in patients with cerebral and myocardial ischemia*. Shock, 2006. **25**(6): p. 571-4.
82. Andersson, U. and K.J. Tracey, *HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 139-62.
83. Andrassy, M., et al., *High-mobility group box-1 in ischemia-reperfusion injury of the heart*. Circulation, 2008. **117**(25): p. 3216-26.
84. Porto, A., et al., *Smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques secrete and proliferate in response to high mobility group box 1 protein*. Faseb j, 2006. **20**(14): p. 2565-6.

85. Kalinina, N., et al., *Increased expression of the DNA-binding cytokine HMGB1 in human atherosclerotic lesions: role of activated macrophages and cytokines*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(12): p. 2320-5.
86. Inoue, K., et al., *HMGB1 expression by activated vascular smooth muscle cells in advanced human atherosclerosis plaques*. *Cardiovasc Pathol*, 2007. **16**(3): p. 136-43.
87. Rouhiainen, A., et al., *Occurrence of amphoterin (HMGI) as an endogenous protein of human platelets that is exported to the cell surface upon platelet activation*. *Thromb Haemost*, 2000. **84**(6): p. 1087-94.
88. Venereau, E., et al., *Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release*. *J Exp Med*, 2012. **209**(9): p. 1519-28.
89. Venereau, E., et al., *HMGB1 and leukocyte migration during trauma and sterile inflammation*. *Mol Immunol*, 2013. **55**(1): p. 76-82.
90. Andersson, U., H. Yang, and H. Harris, *High-mobility group box 1 protein (HMGB1) operates as an alarmin outside as well as inside cells*. *Semin Immunol*, 2018.
91. Stark, K., et al., *Disulfide HMGB1 derived from platelets coordinates venous thrombosis in mice*. *Blood*, 2016. **128**(20): p. 2435-2449.
92. Sitia, G., et al., *Treatment with HMGB1 inhibitors diminishes CTL-induced liver disease in HBV transgenic mice*. *J Leukoc Biol*, 2007. **81**(1): p. 100-7.
93. Orlova, V.V., et al., *A novel pathway of HMGB1-mediated inflammatory cell recruitment that requires Mac-1-integrin*. *Embo j*, 2007. **26**(4): p. 1129-39.

94. Muhammad, S., et al., *The HMGB1 receptor RAGE mediates ischemic brain damage*. J Neurosci, 2008. **28**(46): p. 12023-12031.
95. Jin, H.S., et al., *Mitochondrial Control of Innate Immunity and Inflammation*. Immune Netw, 2017. **17**(2): p. 77-88.
96. Santoni, G., et al., *Danger- and pathogen-associated molecular patterns recognition by pattern-recognition receptors and ion channels of the transient receptor potential family triggers the inflammasome activation in immune cells and sensory neurons*. J Neuroinflammation, 2015. **12**: p. 21.
97. Jimenez-Dalmaroni, M.J., M.E. Gerswhin, and I.E. Adamopoulos, *The critical role of toll-like receptors--From microbial recognition to autoimmunity: A comprehensive review*. Autoimmun Rev, 2016. **15**(1): p. 1-8.
98. PrabhuDas, M.R., et al., *A Consensus Definitive Classification of Scavenger Receptors and Their Roles in Health and Disease*. J Immunol, 2017. **198**(10): p. 3775-3789.
99. Hughes, C.E. and R.J.B. Nibbs, *A guide to chemokines and their receptors*. Febs j, 2018.
100. Lopez-Cotarelo, P., et al., *Beyond Chemoattraction: Multifunctionality of Chemokine Receptors in Leukocytes*. Trends Immunol, 2017. **38**(12): p. 927-941.
101. Murphy, P.M., et al., *International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors*. Pharmacol Rev, 2000. **52**(1): p. 145-76.
102. Zlotnik, A. and O. Yoshie, *Chemokines: a new classification system and their role in immunity*. Immunity, 2000. **12**(2): p. 121-7.

103. Garton, K.J., et al., *Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1)*. J Biol Chem, 2001. **276**(41): p. 37993-8001.
104. Tsou, C.L., C.A. Haskell, and I.F. Charo, *Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme mediates the inducible cleavage of fractalkine*. J Biol Chem, 2001. **276**(48): p. 44622-6.
105. Hundhausen, C., et al., *The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion*. Blood, 2003. **102**(4): p. 1186-1195.
106. Gough, P.J., et al., *A Disintegrin and Metalloproteinase 10-Mediated Cleavage and Shedding Regulates the Cell Surface Expression of CXC Chemokine Ligand 16*. The Journal of Immunology, 2004. **172**(6): p. 3678-3685.
107. Abel, S., et al., *The transmembrane CXC-chemokine ligand 16 is induced by IFN-gamma and TNF-alpha and shed by the activity of the disintegrin-like metalloproteinase ADAM10*. J Immunol, 2004. **172**(10): p. 6362-72.
108. Lee, M., et al., *Tissue-specific Role of CX3CR1 Expressing Immune Cells and Their Relationships with Human Disease*. Immune Netw, 2018. **18**(1): p. e5.
109. Kim, K.W., et al., *In vivo structure/function and expression analysis of the CX3C chemokine fractalkine*. Blood, 2011. **118**(22): p. e156-67.
110. Geissmann, F., S. Jung, and D.R. Littman, *Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties*. Immunity, 2003. **19**(1): p. 71-82.

111. Bain, C.C. and A.M. Mowat, *Intestinal macrophages - specialised adaptation to a unique environment*. Eur J Immunol, 2011. **41**(9): p. 2494-8.
112. Jung, S., et al., *Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(11): p. 4106-14.
113. Vargas, P., et al., *Mechanisms for fast cell migration in complex environments*. Curr Opin Cell Biol, 2017. **48**: p. 72-78.
114. Sedlacek, H.-H., *Immunologie – die Immunabwehr des Menschen, Schutz, Gefahren, Erkrankungen*. 2017.
115. Tan, S.Y. and W. Weninger, *Neutrophil migration in inflammation: intercellular signal relay and crosstalk*. Curr Opin Immunol, 2017. **44**: p. 34-42.
116. Ng, L.G., et al., *Visualizing the neutrophil response to sterile tissue injury in mouse dermis reveals a three-phase cascade of events*. J Invest Dermatol, 2011. **131**(10): p. 2058-68.
117. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nature Reviews Immunology, 2007. **7**: p. 678.
118. Nourshargh, S. and R. Alon, *Leukocyte migration into inflamed tissues*. Immunity, 2014. **41**(5): p. 694-707.
119. Chtanova, T., et al., *Dynamics of neutrophil migration in lymph nodes during infection*. Immunity, 2008. **29**(3): p. 487-96.
120. Abtin, A., et al., *Perivascular macrophages mediate neutrophil recruitment during bacterial skin infection*. Nature Immunology, 2013. **15**: p. 45.

121. Cho, H., et al., *The Loss of RGS Protein-Gα_{i2} Interactions Results in Markedly Impaired Mouse Neutrophil Trafficking to Inflammatory Sites*. Molecular and Cellular Biology, 2012. **32**(22): p. 4561-4571.
122. Kreisel, D., et al., *In vivo two-photon imaging reveals monocyte-dependent neutrophil extravasation during pulmonary inflammation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010. **107**(42): p. 18073-18078.
123. McDonald, B., et al., *Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation*. Science, 2010. **330**(6002): p. 362-6.
124. Slaba, I., et al., *Imaging the dynamic platelet-neutrophil response in sterile liver injury and repair in mice*. Hepatology, 2015. **62**(5): p. 1593-1605.
125. Roth, T.L., et al., *Transcranial amelioration of inflammation and cell death after brain injury*. Nature, 2013. **505**: p. 223.
126. Jain, R., S. Tikoo, and W. Weninger, *Recent advances in microscopic techniques for visualizing leukocytes in vivo*. F1000Research, 2016. **5**: p. F1000 Faculty Rev-915.
127. Proebstl, D., et al., *Pericytes support neutrophil subendothelial cell crawling and breaching of venular walls in vivo*. The Journal of Experimental Medicine, 2012. **209**(6): p. 1219-1234.
128. Stark, K., et al., *Capillary and arteriolar pericytes attract innate leukocytes exiting through venules and 'instruct' them with pattern-recognition and motility programs*. Nat Immunol, 2013. **14**(1): p. 41-51.
129. Weninger, W., M. Biro, and R. Jain, *Leukocyte migration in the interstitial space of non-lymphoid organs*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(4): p. 232-46.

130. Lämmermann, T., *In the eye of the neutrophil swarm-navigation signals that bring neutrophils together in inflamed and infected tissues*. J Leukoc Biol, 2016. **100**(1): p. 55-63.
131. Lämmermann, T., et al., *Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing*. Nature, 2008. **453**: p. 51.
132. Lämmermann, T., et al., *Neutrophil swarms require LTB4 and integrins at sites of cell death in vivo*. Nature, 2013. **498**(7454): p. 371-5.
133. Soehnlein, O., et al., *Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes*. Blood, 2008. **112**(4): p. 1461-1471.
134. Berahovich, R.D., et al., *Proteolytic Activation of Alternative CCR1 Ligands in Inflammation*. The Journal of Immunology, 2005. **174**(11): p. 7341-7351.
135. Buckley, Christopher D., Derek W. Gilroy, and Charles N. Serhan, *Proresolving Lipid Mediators and Mechanisms in the Resolution of Acute Inflammation*. Immunity, 2014. **40**(3): p. 315-327.
136. Soehnlein, O. and L. Lindbom, *Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation*. Nature Reviews Immunology, 2010. **10**: p. 427.
137. Schauer, C., et al., *Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines*. Nature Medicine, 2014. **20**: p. 511.
138. de Oliveira, S., E.E. Rosowski, and A. Huttenlocher, *Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse*. Nature Reviews Immunology, 2016. **16**: p. 378.

139. Nourshargh, S., S.A. Renshaw, and B.A. Imhof, *Reverse Migration of Neutrophils: Where, When, How, and Why?* Trends in Immunology, 2016. **37**(5): p. 273-286.
140. Hamza, B., et al., *Retrotaxis of human neutrophils during mechanical confinement inside microfluidic channels*. Integrative Biology, 2014. **6**(2): p. 175-183.
141. Mathias, J.R., et al., *Resolution of inflammation by retrograde chemotaxis of neutrophils in transgenic zebrafish*. Journal of Leukocyte Biology, 2006. **80**(6): p. 1281-1288.
142. Woodfin, A., et al., *The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo*. Nat Immunol, 2011. **12**(8): p. 761-9.
143. Colom, B., et al., *Leukotriene B4-Neutrophil Elastase Axis Drives Neutrophil Reverse Transendothelial Cell Migration In Vivo*. Immunity, 2015. **42**(6): p. 1075-86.
144. Wang, J., et al., *Visualizing the function and fate of neutrophils in sterile injury and repair*. Science, 2017. **358**(6359): p. 111-116.
145. Abadie, V., et al., *Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after *Mycobacterium bovis* BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes*. Blood, 2005. **106**(5): p. 1843-1850.
146. Sumaria, N., et al., *Cutaneous immunosurveillance by self-renewing dermal $\gamma\delta$ T cells*. The Journal of Experimental Medicine, 2011. **208**(3): p. 505-518.
147. Williams, J.W., et al., *Macrophage Biology, Classification, and Phenotype in Cardiovascular Disease: JACC Macrophage in CVD Series (Part 1)*. J Am Coll Cardiol, 2018. **72**(18): p. 2166-2180.

148. van Furth, R., et al., *The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells*. Bull World Health Organ, 1972. **46**(6): p. 845-52.
149. Kratoofil, R.M., P. Kubes, and J.F. Deniset, *Monocyte Conversion During Inflammation and Injury*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2017. **37**(1): p. 35-42.
150. Crane, M.J., et al., *The monocyte to macrophage transition in the murine sterile wound*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e86660.
151. Cedric Auffray, Michael H. Sieweke, and F. Geissmann, *Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells*. Annual Review of Immunology, 2009. **27**(1): p. 669-692.
152. Brancato, S.K. and J.E. Albina, *Wound Macrophages as Key Regulators of Repair: Origin, Phenotype, and Function*. The American Journal of Pathology, 2011. **178**(1): p. 19-25.
153. Peng, X., et al., *CX3CL1–CX3CR1 Interaction Increases the Population of Ly6C^{hi} CX3CR1^{hi} Macrophages Contributing to Unilateral Ureteral Obstruction–Induced Fibrosis*. The Journal of Immunology, 2015. **195**(6): p. 2797-2805.
154. Gordon, S. and A. Pluddemann, *Tissue macrophages: heterogeneity and functions*. BMC Biol, 2017. **15**(1): p. 53.
155. Jakubzick, C., et al., *Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes*. Immunity, 2013. **39**(3): p. 599-610.
156. Passlick, B., D. Flieger, and H.W. Ziegler-Heitbrock, *Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood*. Blood, 1989. **74**(7): p. 2527-34.

157. Hulsmans, M., F. Sam, and M. Nahrendorf, *Monocyte and macrophage contributions to cardiac remodeling*. J Mol Cell Cardiol, 2016. **93**: p. 149-55.
158. Shi, C. and E.G. Pamer, *Monocyte recruitment during infection and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(11): p. 762-74.
159. Glezeva, N., S. Horgan, and J.A. Baugh, *Monocyte and macrophage subsets along the continuum to heart failure: Misguided heroes or targetable villains?* J Mol Cell Cardiol, 2015. **89**(Pt B): p. 136-45.
160. Hanna, R.N., et al., *The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C- monocytes*. Nat Immunol, 2011. **12**(8): p. 778-85.
161. Auffray, C., et al., *Monitoring of Blood Vessels and Tissues by a Population of Monocytes with Patrolling Behavior*. Science, 2007. **317**(5838): p. 666-670.
162. Hilgendorf, I., et al., *Ly-6Chigh monocytes depend on Nr4a1 to balance both inflammatory and reparative phases in the infarcted myocardium*. Circ Res, 2014. **114**(10): p. 1611-22.
163. Okabe, Y., *Molecular control of the identity of tissue-resident macrophages*. Int Immunol, 2018. **30**(11): p. 485-491.
164. Han, J. and R.J. Ulevitch, *Limiting inflammatory responses during activation of innate immunity*. Nat Immunol, 2005. **6**(12): p. 1198-205.
165. Serhan, C.N. and J. Savill, *Resolution of inflammation: the beginning programs the end*. Nat Immunol, 2005. **6**(12): p. 1191-7.
166. Savill, J., *Apoptosis in resolution of inflammation*. J Leukoc Biol, 1997. **61**(4): p. 375-80.

167. Savill, J., C. Gregory, and C. Haslett, *Cell biology. Eat me or die*. Science, 2003. **302**(5650): p. 1516-7.
168. Martin, P., *Wound healing--aiming for perfect skin regeneration*. Science, 1997. **276**(5309): p. 75-81.
169. Rodrigues, M. and G. Gurtner, *Black, White, and Gray: Macrophages in Skin Repair and Disease*. Curr Pathobiol Rep, 2017. **5**(4): p. 333-342.
170. Davies, L.C. and P.R. Taylor, *Tissue-resident macrophages: then and now*. Immunology, 2015. **144**(4): p. 541-8.
171. Schulz, C., et al., *A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells*. Science, 2012. **336**(6077): p. 86-90.
172. Ginhoux, F., et al., *Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages*. Science, 2010. **330**(6005): p. 841-5.
173. Davies, L.C., et al., *Distinct bone marrow-derived and tissue-resident macrophage lineages proliferate at key stages during inflammation*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 1886.
174. Malissen, B., S. Tamoutounour, and S. Henri, *The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(6): p. 417-28.
175. Tamoutounour, S., et al., *Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin*. Immunity, 2013. **39**(5): p. 925-38.
176. Nahrendorf, M. and F.K. Swirski, *Abandoning M1/M2 for a Network Model of Macrophage Function*. Circ Res, 2016. **119**(3): p. 414-7.

177. Liddiard, K. and P.R. Taylor, *Understanding local macrophage phenotypes in disease: shape-shifting macrophages*. Nat Med, 2015. **21**(2): p. 119-20.
178. Murray, P.J., et al., *Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines*. Immunity, 2014. **41**(1): p. 14-20.
179. Austyn, J.M. and S. Gordon, *F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage*. Eur J Immunol, 1981. **11**(10): p. 805-15.
180. Hume, D.A. and S. Gordon, *Mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80. Identification of resident macrophages in renal medullary and cortical interstitium and the juxtaglomerular complex*. J Exp Med, 1983. **157**(5): p. 1704-9.
181. Hume, D.A., V.H. Perry, and S. Gordon, *The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localisation of antigen F4/80: macrophages associated with epithelia*. Anat Rec, 1984. **210**(3): p. 503-12.
182. Malorny, U., E. Michels, and C. Sorg, *A monoclonal antibody against an antigen present on mouse macrophages and absent from monocytes*. Cell Tissue Res, 1986. **243**(2): p. 421-8.
183. McKnight, A.J., et al., *Molecular cloning of F4/80, a murine macrophage-restricted cell surface glycoprotein with homology to the G-protein-linked transmembrane 7 hormone receptor family*. J Biol Chem, 1996. **271**(1): p. 486-9.
184. Schaller, E., et al., *Inactivation of the F4/80 glycoprotein in the mouse germ line*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(22): p. 8035-43.
185. Chistiakov, D.A., et al., *CD68/macrosialin: not just a histochemical marker*. Lab Invest, 2017. **97**(1): p. 4-13.

186. van der Kooij, M.A., et al., *Human monocyte-derived macrophages express an approximately 120-kD Ox-LDL binding protein with strong identity to CD68*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. **17**(11): p. 3107-16.
187. Gottfried, E., et al., *Expression of CD68 in non-myeloid cell types*. *Scand J Immunol*, 2008. **67**(5): p. 453-63.
188. Nucera, S., D. Biziato, and M. De Palma, *The interplay between macrophages and angiogenesis in development, tissue injury and regeneration*. *Int J Dev Biol*, 2011. **55**(4-5): p. 495-503.
189. Molawi, K., et al., *Progressive replacement of embryo-derived cardiac macrophages with age*. *J Exp Med*, 2014. **211**(11): p. 2151-8.
190. Epelman, S., et al., *Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation*. *Immunity*, 2014. **40**(1): p. 91-104.
191. Hulsmans, M., et al., *Macrophages Facilitate Electrical Conduction in the Heart*. *Cell*, 2017. **169**(3): p. 510-522.e20.
192. Libby, P., M. Nahrendorf, and F.K. Swirski, *Leukocytes Link Local and Systemic Inflammation in Ischemic Cardiovascular Disease: An Expanded "Cardiovascular Continuum"*. *J Am Coll Cardiol*, 2016. **67**(9): p. 1091-103.
193. Sager, H.B., et al., *Proliferation and Recruitment Contribute to Myocardial Macrophage Expansion in Chronic Heart Failure*. *Circ Res*, 2016. **119**(7): p. 853-64.
194. Tay, S.S., et al., *The Skin-Resident Immune Network*. *Curr Dermatol Rep*, 2014. **3**: p. 13-22.

195. Urmacher, C., *Histology of normal skin*. Am J Surg Pathol, 1990. **14**(7): p. 671-86.
196. Liebich, H., *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel, Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis*. Schattauer (Verlag), 2012. **5.**, **völlig überarb. und erw. Auflage.**
197. Hashimoto, D., J. Miller, and M. Merad, *Dendritic cell and macrophage heterogeneity in vivo*. Immunity, 2011. **35**(3): p. 323-35.
198. Boutens, L. and R. Stienstra, *Adipose tissue macrophages: going off track during obesity*. Diabetologia, 2016. **59**(5): p. 879-94.
199. Wynn, T.A., A. Chawla, and J.W. Pollard, *Macrophage biology in development, homeostasis and disease*. Nature, 2013. **496**(7446): p. 445-55.
200. Dupasquier, M., et al., *Macrophages and dendritic cells constitute a major subpopulation of cells in the mouse dermis*. J Invest Dermatol, 2004. **123**(5): p. 876-9.
201. Dupasquier, M., et al., *The dermal microenvironment induces the expression of the alternative activation marker CD301/mMGL in mononuclear phagocytes, independent of IL-4/IL-13 signaling*. Journal of Leukocyte Biology, 2006. **80**(4): p. 838-849.
202. Mowat, A.M., C.L. Scott, and C.C. Bain, *Barrier-tissue macrophages: functional adaptation to environmental challenges*. Nat Med, 2017. **23**(11): p. 1258-1270.
203. Fredman, G., et al., *Self-limited versus delayed resolution of acute inflammation: temporal regulation of pro-resolving mediators and microRNA*. Sci Rep, 2012. **2**: p. 639.

204. Ariel, A. and C.N. Serhan, *New Lives Given by Cell Death: Macrophage Differentiation Following Their Encounter with Apoptotic Leukocytes during the Resolution of Inflammation*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 4.
205. Bratton, D.L. and P.M. Henson, *Neutrophil clearance: when the party is over, clean-up begins*. Trends Immunol, 2011. **32**(8): p. 350-7.
206. Novais, F.O., et al., *Neutrophils and Macrophages Cooperate in Host Resistance against *Leishmania braziliensis* Infection*. The Journal of Immunology, 2009. **183**(12): p. 8088-8098.
207. De Filippo, K., et al., *Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation*. Blood, 2013. **121**(24): p. 4930-4937.
208. Schiwon, M., et al., *Crosstalk between Sentinel and Helper Macrophages Permits Neutrophil Migration into Infected Uroepithelium*. Cell, 2014. **156**(3): p. 456-468.
209. Christ, A., et al., *Dendritic cells in cardiovascular diseases: epiphenomenon, contributor, or therapeutic opportunity*. Circulation, 2013. **128**(24): p. 2603-13.
210. Shortman, K. and S.H. Naik, *Steady-state and inflammatory dendritic-cell development*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(1): p. 19-30.
211. Haddad, Y., et al., *The Dendritic Cell Receptor DNGR-1 Promotes the Development of Atherosclerosis in Mice*. Circ Res, 2017. **121**(3): p. 234-243.
212. Sancho, D., et al., *Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity*. Nature, 2009. **458**(7240): p. 899-903.

213. Sancho, D., et al., *Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin*. J Clin Invest, 2008. **118**(6): p. 2098-110.
214. Huysamen, C., et al., *CLEC9A is a novel activation C-type lectin-like receptor expressed on BDCA3+ dendritic cells and a subset of monocytes*. J Biol Chem, 2008. **283**(24): p. 16693-701.
215. Schraml, Barbara U., et al., *Genetic Tracing via DNNGR-1 Expression History Defines Dendritic Cells as a Hematopoietic Lineage*. Cell, 2013. **154**(4): p. 843-858.
216. Satpathy, A.T., et al., *Re(de)fining the dendritic cell lineage*. Nat Immunol, 2012. **13**(12): p. 1145-54.
217. Roediger, B., et al., *Visualizing dendritic cell migration within the skin*. Histochem Cell Biol, 2008. **130**(6): p. 1131-46.
218. Ng, L.G., et al., *Migratory dermal dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites*. PLoS Pathog, 2008. **4**(11): p. e1000222.
219. Khandoga, A.G., et al., *In vivo imaging and quantitative analysis of leukocyte directional migration and polarization in inflamed tissue*. PLoS One, 2009. **4**(3): p. e4693.
220. Zehrer, A., et al., *A Fundamental Role of Myh9 for Neutrophil Migration in Innate Immunity*. J Immunol, 2018. **201**(6): p. 1748-1764.
221. Woolbright, B.L. and H. Jaeschke, *The Impact of Sterile Inflammation in Acute Liver Injury*. J Clin Transl Res, 2017. **3**(Suppl 1): p. 170-188.
222. Jaeschke, H., *Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts*. J Gastroenterol Hepatol, 2011. **26 Suppl 1**: p. 173-9.

223. Kubes, P. and W.Z. Mehal, *Sterile inflammation in the liver*. Gastroenterology, 2012. **143**(5): p. 1158-1172.
224. Woolbright, B.L. and H. Jaeschke, *Sterile inflammation in acute liver injury: myth or mystery?* Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2015. **9**(8): p. 1027-9.
225. Woolbright, B.L. and H. Jaeschke, *Role of the inflammasome in acetaminophen-induced liver injury and acute liver failure*. J Hepatol, 2017. **66**(4): p. 836-848.
226. McDonald, B. and P. Kubes, *Neutrophils and intravascular immunity in the liver during infection and sterile inflammation*. Toxicol Pathol, 2012. **40**(2): p. 157-65.
227. Menezes, G.B., et al., *Selective Down-Regulation of Neutrophil Mac-1 in Endotoxemic Hepatic Microcirculation via IL-10*. The Journal of Immunology, 2009. **183**(11): p. 7557-7568.
228. Bagher, P. and S.S. Segal, *The mouse cremaster muscle preparation for intravital imaging of the microcirculation*. J Vis Exp, 2011(52).
229. Hungerford, J.E., W.C. Sessa, and S.S. Segal, *Vasomotor control in arterioles of the mouse cremaster muscle*. Faseb j, 2000. **14**(1): p. 197-207.
230. Hoque, R., et al., *Sterile inflammatory response in acute pancreatitis*. Pancreas, 2012. **41**(3): p. 353-7.
231. Hoque, R., A. Farooq, and W.Z. Mehal, *Sterile inflammation in the liver and pancreas*. J Gastroenterol Hepatol, 2013. **28 Suppl 1**: p. 61-7.
232. O'Reilly, D.A. and A.N. Kingsnorth, *A brief history of pancreatitis*. J R Soc Med, 2001. **94**(3): p. 130-2.

233. Cui, Y.Z., et al., *Optimal protocol for total body irradiation for allogeneic bone marrow transplantation in mice*. Bone Marrow Transplantation, 2002. **30**: p. 843.
234. Helmchen, F. and W. Denk, *Deep tissue two-photon microscopy*. Nat Methods, 2005. **2**(12): p. 932-40.
235. Li, J.L., et al., *Intravital multiphoton imaging of immune responses in the mouse ear skin*. Nat Protoc, 2012. **7**(2): p. 221-34.
236. Denk, W., J. Strickler, and W. Webb, *Two-photon laser scanning fluorescence microscopy*. Science, 1990. **248**(4951): p. 73-76.
237. Göppert-Mayer, M., *Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen*. Annalen der Physik, 1931. **401**(3): p. 273-294.
238. Zipfel, W.R., R.M. Williams, and W.W. Webb, *Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences*. Nature Biotechnology, 2003. **21**: p. 1369.
239. Mulisch, M., et al., *Romeis mikroskopische Technik*. 2010, Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl.
240. Benninger, R.K. and D.W. Piston, *Two-photon excitation microscopy for the study of living cells and tissues*. Curr Protoc Cell Biol, 2013. **Chapter 4**: p. Unit 4 11 1-24.
241. Ishikawa-Ankerhold, H.C., R. Ankerhold, and G.P. Drummen, *Advanced fluorescence microscopy techniques--FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM*. Molecules, 2012. **17**(4): p. 4047-132.
242. Vladymyrov, M., et al., *Real-time tissue offset correction system for intravital multiphoton microscopy*. J Immunol Methods, 2016. **438**: p. 35-41.

243. Xu, C., et al., *Multiphoton fluorescence excitation: new spectral windows for biological nonlinear microscopy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(20): p. 10763-8.
244. Bruhn, K.W., et al., *Ly6G-mediated depletion of neutrophils is dependent on macrophages*. Results Immunol, 2016. **6**: p. 5-7.
245. Tschachler, E., et al., *Sheet preparations expose the dermal nerve plexus of human skin and render the dermal nerve end organ accessible to extensive analysis*. J Invest Dermatol, 2004. **122**(1): p. 177-82.
246. Nagao, K., et al., *Murine epidermal Langerhans cells and langerin-expressing dermal dendritic cells are unrelated and exhibit distinct functions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(9): p. 3312-7.
247. Kobayashi, T., et al., *Epidermal structure created by canine hair follicle keratinocytes enriched with bulge cells in a three-dimensional skin equivalent model in vitro: implications for regenerative therapy of canine epidermis*. Vet Dermatol, 2013. **24**(1): p. 77-83.e19-20.
248. Jang, H., et al., *Wound-healing potential of Cultured Epidermal Sheets is unaltered after lyophilization: a preclinical study in comparison to cryopreserved CES*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 907209.
249. Yokouchi, M., et al., *Epidermal tight junction barrier function is altered by skin inflammation, but not by filaggrin-deficient stratum corneum*. J Dermatol Sci, 2015. **77**(1): p. 28-36.
250. Nwaneshiudu, A., et al., *Introduction to confocal microscopy*. J Invest Dermatol, 2012. **132**(12): p. e3.
251. Paddock, S.W., *Principles and practices of laser scanning confocal microscopy*. Mol Biotechnol, 2000. **16**(2): p. 127-49.

252. T., H., *Neuere Methoden in der konfokalen Mikroskopie*. Physikalische Blätter, 1993. **49**(6): p. 489-491.
253. Kolossov, V.L., et al., *Airyscan super-resolution microscopy of mitochondrial morphology and dynamics in living tumor cells*. Microsc Res Tech, 2018. **81**(2): p. 115-128.
254. Bland, M., *Comparing the means of small samples*. In: Hrgs, *An introduction to medical statistics*. Oxford University Press, 2009. **Third edition ed.** Oxford, U.S.A: p. 156-184.
255. Nakagawa, S. and I.C. Cuthill, *Effect size, confidence interval and statistical significance: a practical guide for biologists*. Biol Rev Camb Philos Soc, 2007. **82**(4): p. 591-605.
256. Snyder, R.J., et al., *Macrophages: A review of their role in wound healing and their therapeutic use*. Wound Repair Regen, 2016. **24**(4): p. 613-29.
257. Gerner, M.Y., et al., *Histo-cytometry: a method for highly multiplex quantitative tissue imaging analysis applied to dendritic cell subset microanatomy in lymph nodes*. Immunity, 2012. **37**(2): p. 364-76.

XIII. DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Steffen Massberg für die Möglichkeit der Anfertigung der hier vorliegenden Arbeit in einer großartigen Arbeitsgruppe bedanken.

Ebenfalls danke ich Priv.-Doz. Dr. Sven Reese für die Übernahme, die Durchsicht, die vielen hilfreichen Gedankenanstöße und die Einreichung der Dissertationsschrift recht herzlich.

Dr. med. Konstantin Stark möchte ich für die Möglichkeit des wissenschaftlichen Arbeitens auf diesem faszinierenden Gebiet, der Leitung, hervorragenden Betreuung und dem ansteckenden Enthusiasmus für jeden noch so kleinen Fortschritt meinen Dank aussprechen.

Meinen Dank und höchste Anerkennung gilt an dieser Stelle ebenfalls Dr. vet. med. Meike Miller für die außerordentliche Betreuung und Einarbeitung, der grenzenlosen Geduld und Unterstützung in allen Belangen der Anfertigung der Arbeit zu jeder Zeit.

Für das Gelingen dieser Arbeit trug die tolle Arbeitsatmosphäre im Labor und die große Hilfsbereitschaft der gesamten Arbeitsgruppe erheblich bei: hier möchte ich im Besonderen Michael Lorenz für seinen großen Wissensschatz und die Hilfestellung in jeglichen Laborbelangen und Anna Titova bei der Erarbeitung der immunhistochemischen Techniken danken. Sehr herzlich bedanke ich mich auch bei Dr. Hellen Ishikawa-Ankerhold und Dominic Van den Heuvel für die Unterstützung mit der 2-Photonen-Mikroskopietechnik. Des Weiteren möchte ich mich im Speziellen bei Fitsumbirhan Mehari, Denise Messerer, Thuy-Duong Tran, Niklas Bürgener, Kami Pekayvaz, Dr. med. vet. Vanessa Schneider, Dr. med. vet. Gerhild Rosenberger, Dr. med. vet. Susanne Sauer und der gesamten AG Massberg/Schulz für die unvergessliche und freundschaftliche Zeit im Labor bedanken.

Da die Anfertigung dieser Arbeit teilweise durch ein Stipendium finanziert wurde, danke ich dem SFB 914 und dem Graduiertenprogramm IRTG 914 für die Förderung und die Möglichkeit der Teilnahme an Seminaren und Konferenzen.

Ein großer Dank geht darüber hinaus an meine Eltern für die Ermöglichung des Studiums, an meine Schwester Valerie für ihre positive Art und an meine liebe Familie, die durch die gesamte Studien- und Promotionszeit immer an meiner Seite stand.

Zuletzt möchte ich mich besonders bei meinen Freundinnen Issi, Christin, Elly und Nadine bedanken, die mir durch die gesamte Zeit der Anfertigung dieser Arbeit eine große Stütze waren und mich immer mit ihren lieben Worten motivierten konnten.